

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Departamento de Medicina y Cirugía Animal**



**TESIS DOCTORAL**

**Caracterización y modulación de la inflamación  
peritoneal para limitar la fibrosis causada por el  
líquido de diálisis: modelo en ratón**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Guadalupe Tirma González Mateo**

Director:

**Rafael Selgas Gutiérrez  
Manuel López-Cabrera  
Luiz Guilherme Stark Aroeira**

**Madrid, 2011**

**ISBN: 978-84-694-8490-6**

© Guadalupe Tirma González Mateo, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN Y MODULACIÓN DE LA  
INFLAMACIÓN PERITONEAL PARA LIMITAR LA  
FIBROSIS CAUSADA POR EL LÍQUIDO DE DIÁLISIS:  
MODELO EN RATÓN**

Memoria para optar al grado de Doctor en Biología presentada por:

Guadalupe Tirma González Mateo

Tesis codirigida por:

***Rafael Selgas Gutierrez***

Unidad de Nefrología. Hospital Universitario La Paz

***Manuel López-Cabrera***

Unidad de Biología Molecular. Hospital Universitario La Princesa

***Luiz Guilherme Stark Aroeira***

Unidad de Investigación. Laboratorio de Nefrología Experimental. Hospital Universitario La Paz

Tutora:

***Juana María Flores Landeira***

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Veterinaria. UCM.

Madrid, Mayo 2011



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL

**CARACTERIZACIÓN Y MODULACIÓN DE LA  
INFLAMACIÓN PERITONEAL PARA LIMITAR LA  
FIBROSIS CAUSADA POR EL LÍQUIDO DE DIÁLISIS:  
MODELO EN RATÓN**

**TESIS DOCTORAL**

Guadalupe Tirma González Mateo

Madrid, Mayo 2011





Don Rafael Selgas Gutierrez, Doctor en Medicina, y Don Manuel López-Cabrera y Don Luiz Stark Aroeira, Doctores en Ciencias Biológicas,

### CERTIFICAN

Que Doña Guadalupe Tirma González Mateo, licenciada en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Caracterización y modulación de la inflamación peritoneal para limitar la fibrosis causada por el líquido de diálisis: modelo en ratón”, que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid

Rafael Selgas Gutierrez

Manuel López-Cabrera

Luiz Stark Aroeira



## *Agradecimientos*

Son muchas las personas a las que debo el haber conseguido llegar hasta aquí hoy, que me han ayudado y apoyado durante estos años y me han enseñado a apreciar este trabajo, con todas sus cosas buenas y también sus cosas malas...sí, alguna hubo y habrá, pero eso siempre ayuda a valorar mejor las buenas.

Hace cinco años, cuando empecé a formar parte de este grupo, veía este momento tan lejos que ahora me parece imposible que ya esté llegando. Quiero agradecer de verdad a una persona que en aquel primer momento me abrió la puerta para poder empezar a trabajar en este mundo, Xabier Barandiarán, que me aconsejó y me ayudó a encontrar este camino. Sin su ayuda no estaría aquí ahora.

Debo agradecer también a uno de mis directores de tesis, Manuel López-Cabrera, quien me acogió en el grupo en aquel entonces cuando tan poco sabía de trabajar en un laboratorio. A Marta Ramírez, un "GRACIAS" muy especial, tú que me sufriste durante los primeros meses, fue muy fácil aprender y trabajar contigo, y me llevo muchas anécdotas y buenos momentos de aquella época...¿te acuerdas de Demian?. Aunque ahora prácticamente no nos vemos, me acuerdo mucho de ti y espero que te esté yendo todo genial.

A mis compañeros, Jesús y M<sup>a</sup> Luisa, que ahora no estamos en el mismo laboratorio pero hemos compartido cinco años de trabajo, debo decirles que hemos pasado ratos buenos y otros no tan buenos, pero me quedo con los primeros que son más importantes, tanto en el laboratorio como fuera de él, en los congresos por Turquía y Estrasburgo. Gracias, porque he aprendido también mucho con vosotros, y con la experiencia de haber formado parte del grupo. A Abelardo, que tiene un corazón enorme y siempre he podido acudir a él cuando necesitaba apoyo, ayuda o consejo, o simplemente un amigo con quien hablar. Mil gracias Abe, por todo. A Pilar y Patri, que aunque en persona hemos trabajado menos tiempo juntas, desde la distancia hemos seguido con muestras de ratones, de pacientes... Patri, menudo trabajito con **los ELISAs**...

Muchas gracias por vuestra ayuda y amistad a toda la gente de la Princesa, que sois muchos y algunos que ya se han ido (Yoli, Samu, Paloma, Manu, Paqui, Pedro, Mati, Iñaqui, Elena, Vicente, Natacha, Álvaro, M<sup>a</sup> Ángeles, Belén...) madre mía, perdonadme porque no os nombro a todos, sois muchos, pero gracias a todos por las veces que me habéis ayudado. Nestea, espero que te vaya muy bien por tu tierra y que no te olvides de los años que pasaste aquí, mucha suerte con todo. No me olvido de la gente de la 1<sup>a</sup>, gracias por los préstamos de anticuerpos, ayuda con dudas varias, y los buenos ratos en la comida y con los cafés. Manus, Román..., bueno, vosotros sí que sois muchos, perdonadme también por no nombraros, pero sabed que sin vosotros no hubiera podido hacer muchas de las cosas con las que he trabajado y que os estoy muy agradecida.

Debo agradecer también de forma muy especial a todo el grupo de Mesotelio: Jose Antonio Jiménez Heffernan, Auxiliadora Bajo, Antonio Fernández Perpén, Jose Antonio Sánchez Tomero, Gloria del Peso, Rafael Sánchez Villanueva, a toda la gente de la 8<sup>a</sup> de la Paz, Luisa, Carmen, Marta, etc. Porque sin ellos está claro que no hubiera podido llegar hasta aquí. También quisiera dar las gracias a otras personas con las que hemos colaborado y con quienes me gustaría tener la oportunidad de volver a hacerlo en un futuro, como Marta Ruiz Ortega y Alberto Ortiz y sus grupos de trabajo.

Y de toda la gente de la Paz, cuántos buenos ratos he vivido en nuestro edificio, cuántas cosas han pasado. Me llevo conmigo miles de anécdotas y risas, historias de robos, locos, inundaciones y muchas cosas más. No sé ni por dónde empezar. Son muchas las personas que quisiera nombrar. A Teresa Bellón y a "sus chicos", el laboratorio con más premios HULP, por algo será. Vir, Arancha, Salva, los que se fueron (Esther y Balta) y las que han venido hace poquito. Habéis sido un gran apoyo para mí, ¡gracias!. A los laboratorios vecinos y no tan vecinos, de Luis Álvarez, Raquel y Sara;

Cerebrovascular, María, Berta, Julia, Silvi, Pilar, Jaime; los de Juanan, Mayte, las Ed's, Terapia, Metóseo, los de Juan A. Rey, Secuenciación, ya sabéis: las "Susanas" del citómetro, del almacén... Gracias por todos los préstamos de pipetas, centrífugas, vortex, anticuerpos, las ayudas y los grandes momentos en Cultivos. A las que ahora emigran a otras tierras, Yolanda, mi compi pretésica, Amada y Rosa, muchísima suerte, y gracias por todo. A todos los de cirugía experimental tengo que decirles que ha sido un placer poder trabajar con ellos, hemos pasado muchas horas juntos y ellos han hecho que fueran más fáciles: Carlota, Maribel, Pablo, Pedro, Juan, Isabel, Toñi, Javi, Delia, Mariana (ánimo que ya te queda poco para conseguirlo, seguro que luego encuentras un sitio estupendo en Brasil, no se me olvida que has prometido ser una gran guía turística...). A Paz y Susana, qué puedo decir, a Loli y todas las personas que me han aguantado sin tuvieran que hacerlo... Gracias. A todas aquellas que han pasado por nuestro labo y me han ayudado a pasar los momentos difíciles, quizá sin saberlo, gracias de corazón, aunque probablemente no lean esto (y si lo leen tal vez no lo entiendan), pero ya encontraré la forma de decírselo en persona.

Debo agradecer muy especialmente al Dr. Rafael Selgas su dirección, porque siempre me ha transmitido ilusión y fuerzas para llevar a cabo este trabajo y sin su apoyo y su esfuerzo por mantener este grupo no sé si yo hubiera llegado hasta aquí.

Estoy dejando lo difícil para el final, aquellas personas con las que más tiempo he compartido, con quienes he trabajado mano a mano tantísimas horas durante estos años, no puedo expresar aquí lo importante que ha sido trabajar con ellos este tiempo. He aprendido mucho, nos hemos reído juntos, nos hemos enfadado y perdonado muchas veces, y tanto lo bueno como lo malo me ha enseñado a trabajar en equipo y convivir en el laboratorio. Por supuesto que estoy hablando de ti Vane, que estás como una cabra y se te nota cuando estás en el edificio, mucha suerte con la biología, te advertimos que te lo pensarás pero no hiciste caso, espero que te vaya muy bien cuando termines. Luiz, mi director, pero a quien también considero un amigo ya, esto sí que es difícil... gracias por creer en mí cuando empecé aquí, por tu ayuda, por enseñarme tantas cosas de inmunología, de citometría, de trabajar con animales, y tantas y tantas otras cosas. Por corregirme la tesis mil veces, espero que los buenos momentos hayan compensado a los malos, que como ya he dicho también los hubo, pero porque han sido muchas horas juntos.

Y si la gente que me ha acompañado estos años dentro del ámbito laboral por supuesto ha sido fundamental, como compañeros y como amigos, no puedo concluir estas líneas sin nombrar también a las personas de fuera del trabajo que me han apoyado sin entender muy bien de qué trata todo esto, pero que sabían que era importante para mí y por ello han estado a mi lado, dándome **ánimos** cuando lo he necesitado. A mis amigos, qué os puedo decir, que valeis más que el oro. Hemos pasado momentos muy buenos y otros muy amargos, pero hemos estado unidos y estoy segura de que, aunque puedan separarse los caminos de algunos de nosotros en un futuro, seguiremos siempre juntos. A mi familia, a mis padres, muchas gracias por demostrarme que estáis orgullosos de lo que hago; a mis tíos y mis primos, que sé que se alegrarán también conmigo cuando supere esta etapa y lo celebraremos juntos. Ellos han sido un gran apoyo para mí, y lo seguirán siendo, tanto los que están como los que se fueron.... A mi casi-hermana Aniusky y a Adri, que los pobres se han tragado todas mis quejas y mis agobios de estos últimos tiempos, gracias por aguantarme y quererme tanto.

Por último no quiero olvidarme de **nombrar** a mis ratones **y darles también las gracias**, ellos está claro **que no leerán esto, ¡¡pero también las merecen...!!**

A los que me haya podido dejar en el tintero, espero que me perdonen, es imposible mencionar a todas las personas que me han apoyado en esta etapa, no me lo tengáis en cuenta.

Gracias a todos.

|   |        |
|---|--------|
| ABREVIATURAS.....   | 1-2    |
| I. RESUMEN / SUMMARY.....   | 3-5    |
| II. INTRODUCCIÓN Y JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.....   | 7-23   |
| II.1.    Importancia de la fibrosis en las enfermedades:<br>La inflamación como agente causal   |        |
| II.2.    La Diálisis Peritoneal:<br>Escenario de fenómenos inflamatorios y formación de fibrosis  |        |
| II.3.    Episodios de peritonitis agudas y su repercusión en diálisis peritoneal  |        |
| II.4.    Cambios peritoneales en DP en ausencia de peritonitis agudas   |        |
| II.5.    Bioincompatibilidad de las soluciones de diálisis peritoneal   |        |
| II.6.    Factores que intervienen en el reclutamiento y la activación celular   |        |
| III. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....   | 25-27  |
| III.1.    Hipótesis de trabajo  |        |
| III.2.    Objetivos del estudio   |        |
| IV. RESULTADOS.....   | 29-105 |
| IV.1.    Diseño y desarrollo de un modelo <i>in vivo</i> para el estudio de la<br>exposición de la membrana peritoneal al líquido de diálisis   |        |
| IV.1.1    Elección del modelo de experimentación  |        |
| IV.1.1.1.  Modelos animales de diálisis peritoneal: relevancia,<br>dificultades y futuro  |        |
| IV.1.1.2.  Diálisis peritoneal experimental   |        |
| IV.1.2.    Caracterización y desarrollo del modelo  |        |
| IV.1.2.1.  Exposición crónica del peritoneo de ratón a líquido de<br>diálisis: alteraciones estructurales y funcionales de la<br>membrana peritoneal  |        |
| IV.1.2.2.  Caracterización de la transición epitelio-mesenquimal de<br>las células mesoteliales en un modelo en ratón de<br>exposición peritoneal crónica a líquidos con alto<br>contenido en glucosa |        |
| IV.2.    Caracterización de la progresión de la inflamación causada por la<br>exposición del peritoneo al líquido de diálisis   |        |
| IV.2.1.    La exposición a LD da lugar a una inflamación peritoneal crónica   |        |
| IV.2.1.1.  Caracterización de la inflamación inducida por líquido de<br>diálisis  |        |
| IV.3.    Análisis del efecto de la modulación de la inflamación en el daño<br>peritoneal. Potencialidad de la inflamación como diana terapéutica  |        |
| IV.3.1.    Inhibición de la inflamación   |        |
| IV.3.1.1.  COX-2 media las alteraciones de la membrana peritoneal<br>inducidas por líquido de diálisis  |        |

IV.3.2. Modulación de la inflamación

IV.3.1.2. *Paricalcitol, un activador del receptor de vitamina D, modula selectivamente la IL-17 y previene la fibrosis en un modelo en ratón de diálisis peritoneal*

|  |         |
|--|---------|
| <b>V. DISCUSIÓN</b> .....                            | 107-117 |
| <b>VI. CONCLUSIONES</b> .....                        | 119-122 |
| <b>VII. PERSPECTIVAS DE ESTA INVESTIGACIÓN</b> ..... | 123-125 |
| <b>VIII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....                      | 127-142 |
| <b>IX. ANEXO</b> .....                               | 143-148 |

| ABREVIATURA | SIGNIFICADO   |
|-------------|---|
| AGEs        | productos glicosilados, “Advanced Glycation End-Products”   |
| CCL2        | MCP-1   |
| CCR2        | Receptor de CCL2  |
| CM          | Célula Mesotelial   |
| DP          | Diálisis Peritoneal   |
| ECM         | Matriz Extracelular   |
| ELISA       | Enzyme-linked Immunosorbent Assay   |
| EMT         | Transición Epitelio-Mesenquimal   |
| EPO         | Eritropoyetina  |
| FGF         | Factor de Crecimiento de Fibroblastos, Fibroblasts Growth Factor  |
| Foxp3       | Factor de transcripción “Forkhead box protein 3”  |
| GDP         | Productos de degradación de la glucosa, glucose degradation products  |
| GM-CSF      | Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor; Factor estimulador de colonias de Granulocitos/Macrófagos |
| HPMC        | Human Peritoneal Mesothelial Cell, célula mesotelial peritoneal humana                                      |
| ICAM-1      | Molécula de Adeshión Intercelular-1   |
| IF          | Inmunofluorescencia   |
| IFN         | Interferón  |
| IHQ         | Inmunohistoquímica  |
| IL          | Interleuquina   |
| KO          | Knock-out   |
| LD          | Líquido de Diálisis   |
| LPS         | Lipopolisacárido  |
| MAPK        | proteína kinasa activada por mitógeno   |
| MCP-1       | proteína quimiotáctica de monocitos   |
| MIP         | Proteína Inflamatoria de Macrófagos   |
| MP          | Membrana Peritoneal   |



| ABREVIATURA    | SIGNIFICADO   |
|----------------|---|
| NF- $\kappa$ b | Factor nuclear de transcripción- $\kappa$ b   |
| PET            | Test de Equilibrio Peritoneal   |
| PG             | Prostaglandina  |
| PMN            | Células Polimorfonucleares  |
| RAGE           | Receptor para los AGEs  |
| RANTES         | Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted; quimioquina también conocida como CCL-5 |
| SMA            | Smooth Muscle Actin, actina de músculo liso   |
| TGF- $\beta$   | Transforming Growth Factor- $\beta$   |
| Th1            | Linfocitos T helper 1   |
| Th2            | Linfocitos T helper 2   |
| TNF- $\alpha$  | Factor de Necrosis Tumoral alpha  |
| Tregs          | Células T reguladoras   |
| UF             | Ultrafiltración   |
| UFF            | Ultrafiltration Failure, fallo de ultrafiltración   |
| VCAM-1         | molécula de adhesión celular vascular   |
| VDR            | Receptor de la vitamina D   |
| VEGF           | Vascular Endothelial Growth Factor, factor de crecimiento del endotelio vascular                  |
| VLA-4          | Very Late Antigen-4, integrina $\alpha 4\beta 1$  |

## **I. RESUMEN**



## Resumen

Tras una lesión tisular aparece un proceso inflamatorio destinado a la reparación de la herida. Si éste persiste, la regeneración puede ser anómala, con aumento de factores angiogénicos y matriz extracelular, que lleva a la fibrosis. Esto es un problema común a muchas patologías. Estos procesos tienen lugar también en el peritoneo de pacientes sometidos a diálisis peritoneal (DP), una terapia sustitutiva del riñón que consiste en administrar un líquido hiperosmótico en la cavidad peritoneal. Esto genera un gradiente a través de la membrana peritoneal (MP), drenando de la sangre el exceso de líquido y metabolitos. Sabemos que las peritonitis agudas por infección o por hemoperitoneo aceleran el daño<sup>1</sup>, que consiste en fibrosamiento, vasculopatías<sup>2-4</sup>, formación de nuevos vasos y pérdida de la capacidad de ultrafiltración (UF)<sup>5</sup>. Sin embargo en ausencia de peritonitis agudas también se desarrollan estas alteraciones debido a que los líquidos de diálisis (LD) son irritantes para el peritoneo<sup>6</sup>. Numerosas evidencias correlacionan fenómenos de inflamación con el deterioro de la MP. Aún así no existen estudios sobre la implicación de la evolución de la inflamación a nivel global durante tratamientos de DP. Las biopsias peritoneales o el efluente drenado proporcionan mucha información sobre el deterioro de la MP en pacientes en DP, pero ambos tipos de muestras presentan limitaciones para el estudio de ciertos mecanismos involucrados en el proceso. Los modelos animales suplen las deficiencias de los estudios con muestras humanas.

Desarrollamos un modelo en ratón de exposición de la MP al LD, que nos ha permitido confirmar los hallazgos observados en humanos, y analizar la secuencia de fenómenos que suceden a lo largo del tiempo. Observamos una inflamación crónica aséptica mantenida en la cavidad peritoneal, que implica la producción de citoquinas y quimioquinas a la cavidad peritoneal a lo largo del proceso. Además, existe un aumento paulatino de la celularidad en el efluente. Entre las células drenadas, los linfocitos B disminuyen desde las etapas iniciales y los T aumentan. El mayor incremento lo experimentan los macrófagos. Además, aumentan MCP-1 y GM-CSF, implicadas en la atracción y activación de monocitos y la proliferación y diferenciación de progenitores de granulocitos/macrófagos. Esta inflamación influye en la aparición de fibrosis, transición epitelio-mesenquimal de las células mesoteliales, reclutamiento celular, neovascularización y activación de fibroblastos residentes, así como aparición de nuevas células fibroblastoides. Esto genera alteraciones en la capacidad de UF de la MP y un engrosamiento con el tiempo debido, por una parte, a un aumento de matriz, y por otra, a un acúmulo de células de origen hematopoyético (CD45<sup>+</sup>) adheridas a la MP. Estas células CD45<sup>+</sup> coexpresan FSP-1, marcador de fibroblastos. Esto significa que estas células están jugando un papel relevante en la generación de matriz y aparición de fibrosis en nuestro modelo. Un factor importante en la feneratoración de inflamación aséptica es la presencia de GDPs en el LD. Comprobamos que el tratamiento con LD pobre en GDPs genera una menor inflamación caracterizada por la disminución de macrófagos. Estos datos muestran la implicación de una inflamación crónica causada por los LD en el daño a la MP, por lo que decidimos actuar sobre la inflamación mediante un agente antiinflamatorio, Celecoxib, y un modulador de inflamación: Paricalcitol. La enzima ciclooxigenasa (COX) es diana de drogas antiinflamatorias y tiene dos isoformas: COX-1 (constitutiva) y COX-2 (inducida en condiciones patológicas)<sup>7</sup>. El Celecoxib inhibe específicamente COX-2. Los resultados muestran que el Celecoxib genera menor grosor de MP y protege la UF. Además, el número total de células drenadas disminuye, principalmente los macrófagos. Por otra parte, el Paricalcitol es un análogo de la forma activa de la vitamina D, la cual tiene efecto inmunorregulador y fibroprotector. El grupo con Paricalcitol presenta menor grosor de MP y una cierta recuperación de la capacidad de UF frente al tratado sólo con LD. Además, la IL-17 disminuye, y aumenta el número de células T CD8<sup>+</sup> que expresan un fenotipo T regulador. Se ha descrito que las células secretoras de IL-17 y las T reguladoras pueden tener un precursor común. Paricalcitol podría actuar estimulando la diferenciación de éste precursor hacia un fenotipo T regulador<sup>8</sup>.

Estos resultados demuestran que la regulación de la actividad inflamatoria generada por los LD permitirá disminuir las complicaciones que se producen como consecuencia de los tratamientos de DP.

## Summary

After tissue injury, an inflammatory process appears, designed to repair the wound. If the problem persists, regeneration may be abnormal, with increased angiogenic factors and extracellular matrix, leading to fibrosis. This is a problem common to many diseases. These processes also occur in the peritoneum of patients undergoing peritoneal dialysis (PD), a kidney replacement therapy that consist on the administration of a hyperosmotic fluid in the peritoneal cavity. This creates a gradient across the peritoneal membrane (PM), draining excess fluid and metabolites from blood. Acute peritonitis due to infection of hemoperitoneum accelerates the damage<sup>1</sup>, which consists on fibrosis, vascular diseases<sup>2-4</sup>, new vessels formation and loss of the ability of ultrafiltration (UF)<sup>5</sup>. However, these alterations also take place in the absence of acute peritonitis, because dialysis fluids (PDF) are irritating for the peritoneum<sup>6</sup>. Many evidences correlate phenomena of inflammation with the deterioration of the MP. In spite of this, there are no global studies about the implication of the evolution of inflammation during PD treatments. Peritoneal biopsies or drainage effluent provide much information about the deterioration of the MP in PD patients, but both techniques have limitations for the study of certain mechanisms involved in the process. Animal models supplement the shortcomings of the studies with human samples.

We developed a mouse model of PM exposure to PDF, which allowed us to confirm these findings in humans, and analyze the sequence of events that happens along time. We observed a constant aseptic chronic inflammation in the peritoneal cavity, which involves the production of cytokines and chemokines by both resident cells in the PM as those that are recruited to the peritoneal cavity during the process. Among drained cells, B cells decreased from the initial stages and T increased. The biggest increase was experienced by macrophages. Furthermore, increased MCP-1 and GM-CSF, involved in the attraction and activation of monocytes and the proliferation and differentiation of progenitors of granulocytes / macrophages. This inflammation affects the development of fibrosis, epithelial-mesenchymal transition of mesothelial cells, cell recruitment, neovascularization and activation of resident fibroblasts and new appearance of fibroblastoid cells. This generates changes in the ability of UF of PM and thickening with time due, in part, to increased matrix, and the other to an accumulation of cells of hematopoietic origin (CD45 +) attached to the PM. In this regard, CD45 + cells infiltrated into the tissue also coexpress and FSP-1, a marker of fibroblasts. This means that these cells are playing an important role in the generation of matrix and development of fibrosis in our model. An important factor implicated in the generation of an aseptic inflammation is the presence of GDPs in the PDF. We show that the treatment with low-GDPs PDF generates a lower inflammatory reaction, characterized by a reduction of macrophages. These data show the involvement of chronic inflammation caused by PDF on damage to the PM, so we decided to act on inflammation by anti-inflammatory drug, Celecoxib, and a modulator of inflammation: Paricalcitol. The enzyme cyclooxygenase (COX) is a target of anti-inflammatory drugs and has two isoforms: COX-1 (constitutive) and COX-2 (induced in pathological conditions)<sup>7</sup>. Celecoxib specifically inhibits COX-2. The results show that celecoxib produces less thick and protects the UF PM. In addition, the total number of drained cells decreases, mainly macrophages. Furthermore, Paricalcitol is an analog of the active form of vitamin D, which has immunomodulatory and fibroprotector effects. The paricalcitol group showed less thickness of MP and a recovery of UF capacity. In addition, IL-17 decreases and increases the number of CD8 + T cells that express a T regulatory phenotype. It has been described that IL-17 secreting cells and T regulatory cells may have a common precursor. Paricalcitol may act stimulating the differentiation of this precursor to a T regulatory phenotype<sup>8</sup>.

These results demonstrate that the regulation of the inflammatory activity generated by the PDF will reduce the complications that occur as a result of PD treatments.

## II. INTRODUCCIÓN



## II.1. Importancia de la fibrosis en las enfermedades: la inflamación como agente causal

La respuesta general de cualquier tejido tras un daño independientemente de su origen, ya sea mecánico o por un agente irritante o infeccioso, es eliminar la fuente del daño y el tejido dañado con el fin de restaurar su arquitectura y funcionalidad. La reparación y regeneración del tejido se lleva a cabo mediante la colaboración de varios procesos interrelacionados y solapantes en el tiempo (Figura 1).

Al producirse el daño se inicia rápidamente la coagulación y la formación de una matriz provisional para evitar la pérdida de sangre. A consecuencia de esto se desencadena siempre una **reacción inflamatoria aguda**. Ésta implica la llegada de neutrófilos y posteriormente macrófagos, que fagocitan y eliminan agentes infecciosos y tejido dañado, y liberan factores relacionados con migración y división celular<sup>9</sup>. A continuación comienza una secuencia de eventos caracterizada por: angiogénesis, generación de matriz, formación de tejido granular, contracción de la herida y regeneración del tejido. En la *angiogénesis* o neovascularización, crecen nuevos vasos sanguíneos para favorecer el aporte de oxígeno y nutrientes<sup>10</sup>. La generación de *matriz extracelular* (ECM, por las siglas en inglés “Extra-Cellular Matrix”) es llevada a cabo por los fibroblastos, mediante la secreción fundamentalmente de colágeno y fibronectina<sup>9</sup>. El *tejido granular* es necesario para rellenar el espacio de la herida, y se compone de nuevos vasos sanguíneos, fibroblastos, células inflamatorias, miofibroblastos y los componentes de la ECM provisional. Las citoquinas secretadas por las células inflamatorias juegan un papel muy importante en la activación de fibroblastos<sup>11-13</sup> para el aumento de la producción de matriz y de la expresión de  $\alpha$ -actina ( $\alpha$ -SMA), lo que los convierte en miofibroblastos. Esto favorece la *contracción de la herida*, con el fin de unir los márgenes de la misma<sup>9,14</sup>. En la *regeneración*, las células del epitelio correspondiente se desplazan sobre la herida, cubriéndola.



**Figura 1.-** Esquema del proceso de reparación y remodelación de tejido dañado.



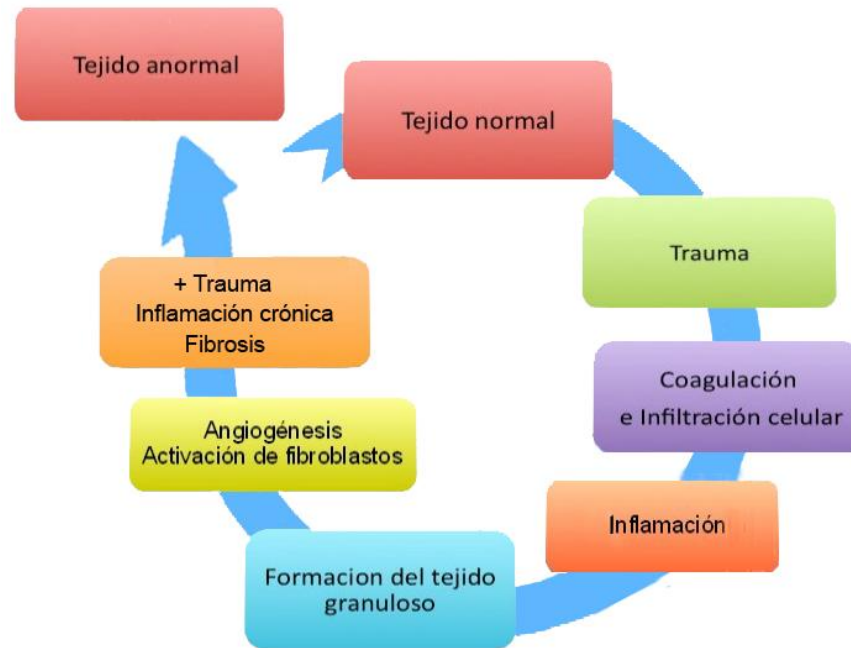
El proceso de remodelación conlleva la realineación del colágeno y la degradación del exceso del mismo por colagenasas y otros factores, así como la eliminación de las células que ya no se precisan mediante apoptosis<sup>13</sup>. Así la cantidad de fibroblastos y otros tipos celulares en la herida disminuye.

El desarrollo correcto de estos procesos es fundamental para una regeneración completa. En el tejido embrionario de los mamíferos la regeneración es perfecta, mientras que en el adulto puede producirse una acumulación de tejido fibroso. Esto es debido a diferencias en la generación de la respuesta inflamatoria<sup>15</sup>. Estudios en ratón demuestran que esta respuesta en heridas embrionarias difiere de la de los adultos en el número de células inflamatorias reclutadas a la herida y las subpoblaciones de células activadas<sup>16</sup>. Estas diferencias pueden determinar el perfil de factores de crecimiento y citocinas liberadas en los sitios de la herida fetal y adulta<sup>16</sup>.

Una **inflamación sostenida** que no se resuelve correctamente, se cronifica y se produce un aumento de síntesis de factores de crecimiento, factores fibrogénicos y proangiogénicos, activación de fibroblastos y una regeneración tisular anómala (Figura 2). Esto limita la eliminación de los fibroblastos y aumenta la formación de fibrosis. Esta fibrosis consiste en la aparición de un exceso de deposición de ECM, compuesta principalmente por varios tipos de colágeno, laminina, entactina, heparán-sulfato, proteoglicanos y fibronectina<sup>17-18</sup>. Los principales responsables de la producción y recambio de la ECM son los **fibroblastos**. Pero los fibroblastos residentes en el tejido no son los únicos implicados en la aparición de fibrosis. Otras células colaboran en este proceso, tanto en el mantenimiento de la inflamación que lo induce, como en la aparición de nuevas células fibroblastoides también implicadas en la generación de ECM. Así, se ha comprobado la aparición de células precursoras de fibroblastos que podrían provenir de médula ósea, llamadas fibrocitos, en cicatrices formadas en heridas de piel<sup>19</sup>, en riñón<sup>20</sup> o en pulmón<sup>21-22</sup>. Estas células llegarían al lugar del daño atraídas por quimioquinas secretadas por células inflamatorias<sup>22</sup>. Además, células ya diferenciadas presentes en el tejido pueden sufrir una transformación a un fenotipo mesenquimal en respuesta a determinadas citoquinas, y adquirir características fibroblastoides, como se ha comprobado que sucede en células epiteliales (EMT, del inglés epithelial-to-mesenchymal transition)<sup>23</sup> o en células endoteliales (EnMT, endothelial-to-mesenchymal transition)<sup>24-25</sup>.

Por otro lado, la **ECM** proporciona no sólo un soporte estructural, sino también la habilidad de interactuar con moléculas de adhesión, y secuestrar citoquinas y factores de crecimiento, esenciales para la proliferación celular y síntesis de más ECM<sup>26</sup>. Por ejemplo, determinados proteoglicanos (*heparín/heparán-sulfato*) actúan como receptores de baja afinidad para el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), VEGF e integrinas, dirigiendo al ligando hacia la superficie celular. Otros proteoglicanos (*decorinas*), además de tener un papel en la

fibrinogénesis de colágeno, actúan como moduladores de la disponibilidad del TGF- $\beta$ , ligándose a él y neutralizando su actividad al impedir que se una a su receptor en la célula diana. El complejo PG/TGF- $\beta$ 1 se deposita en la ECM, donde actúa como reservorio de TGF- $\beta$ 1. Otros proteoglicanos (inter- $\alpha$ -tripsina) actúan como mediadores anti-inflamatorios por su capacidad de inhibir serin-proteasas, lo que resulta en la supresión de la actividad de células inmunes, inhibición de metástasis y estabilización de la arquitectura de la ECM<sup>26</sup>.



*Figura 2.- Esquema del proceso de aparición de tejido fibrótico como consecuencia de un daño tisular.*

Por tanto, a pesar de las diferentes etiologías y manifestaciones clínicas, las enfermedades fibroproliferativas están asociadas con una **inflamación crónica**, como ocurre en la cirrosis<sup>27</sup>, en la fibrosis renal<sup>28</sup> o en la aterosclerosis<sup>29</sup>.

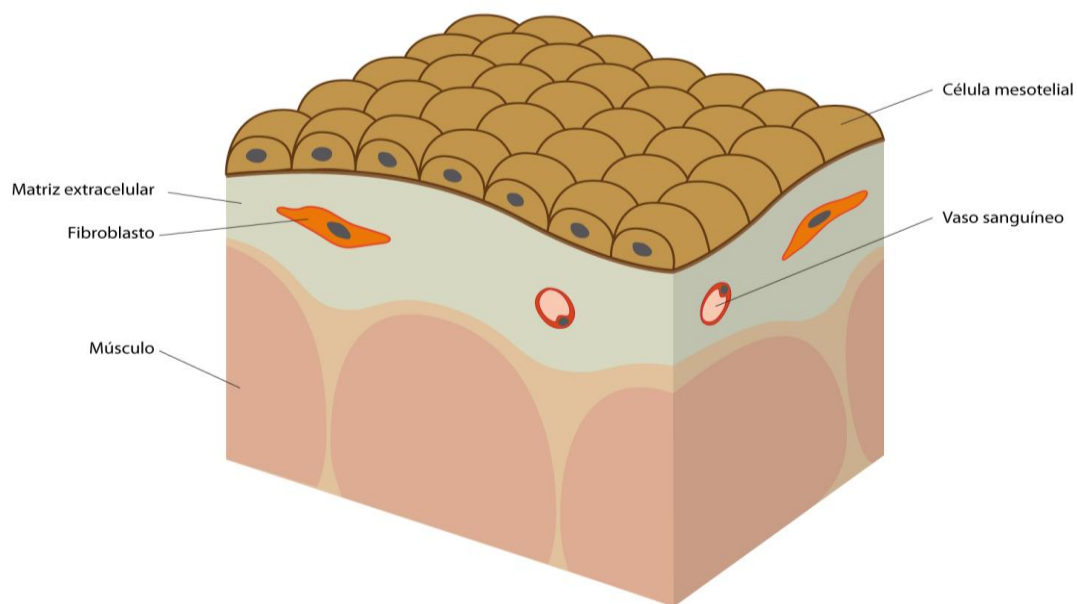
La **fibrosis** es una importante causa de morbilidad y complicaciones médicas, ya que se modifica la estructura y funcionalidad típicas del tejido u órgano afectado. Así por ejemplo, en el ojo, puede resultar en una disminución de la visión o incluso ceguera; en el sistema nervioso, puede ocasionar fallos en la restauración de la función neuronal; en el sistema gastrointestinal puede provocar un mal funcionamiento de los intestinos; en órganos reproductores, infertilidad, etcétera<sup>15</sup>. De hecho, la fibrosis está relacionada con cerca del 45% de las muertes que tienen lugar en países desarrollados<sup>17</sup>.

## II.2 La Diálisis Peritoneal: escenario de fenómenos inflamatorios y formación de fibrosis

Cuando la función de los riñones disminuye a menos de 10 ó 15 por ciento, el individuo necesita de alguna terapia de reemplazo renal para mantenerse con vida, ya sean tratamientos que

limpian la sangre o un trasplante de riñón. Los pacientes con fallo renal sufren uremia, término que fue descrito por primera vez por Piorry *et al.* en 1840<sup>30</sup> y se define como un conjunto de síntomas a nivel sistémico producido por la acumulación en la sangre de los productos tóxicos que, en estado normal, son eliminados por el riñón y que se hallan retenidos por el trastorno del funcionamiento renal.

La Diálisis Peritoneal (DP) es una de las técnicas que se utilizan para el tratamiento de la insuficiencia renal<sup>31</sup>. Su objetivo es eliminar las moléculas pequeñas tóxicas que el organismo no elimina de forma natural, sin la eliminación de aquellas esenciales como el  $\text{Ca}^{2+}$ . Consiste en la instilación en la cavidad peritoneal de un líquido dializante (LD) hiperosmótico, creando un gradiente a través de la **membrana peritoneal (MP)** desde la sangre, que permite el intercambio de solutos y agua. A este proceso de intercambio se le conoce con el nombre de **Ultrafiltración (UF)**. La MP está formada por una monocapa de células mesoteliales (CM) que descansan sobre una ECM, la cual alberga a su vez capilares sanguíneos, fibroblastos y otras células residentes (Figura 3).



**Figura 3.-** Diálisis Peritoneal: estado inicial de la membrana que recubre el peritoneo.

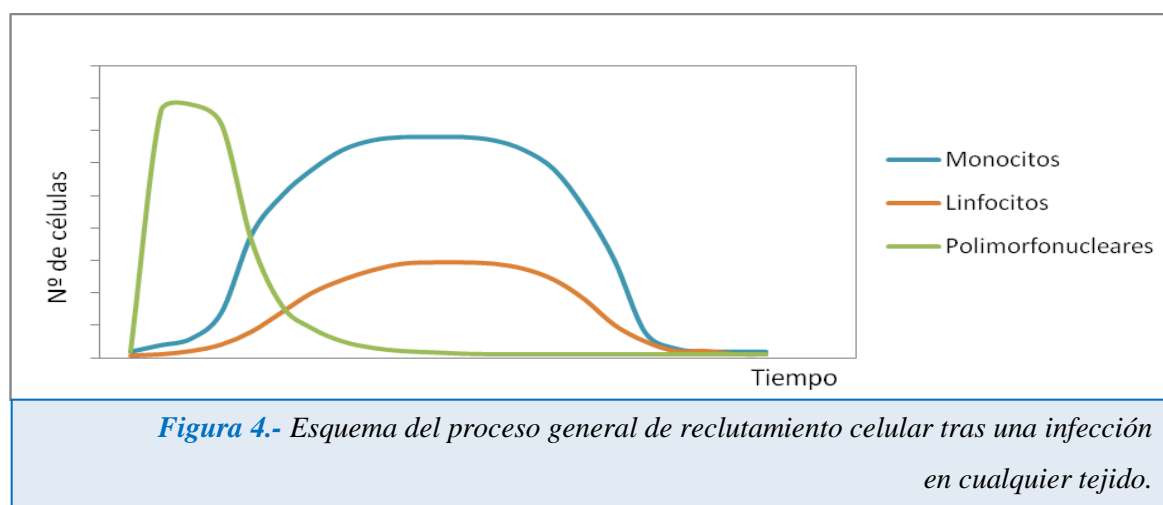
A largo plazo, se ha comprobado que este tratamiento provoca modificaciones en la MP. Los pacientes estables en DP están expuestos a una media de 2200-7000 L de líquido de diálisis al año<sup>26</sup>, y pueden permanecer con este tratamiento durante años. En las biopsias peritoneales de pacientes tratados de forma prolongada se aprecian cambios como la desaparición parcial de la monocapa de CM<sup>32</sup>, cambios morfológicos en dichas células hacia un fenotipo fibroblastoide (EMT)<sup>33</sup>, fibrosis<sup>34</sup>, vasculopatías (hialinización progresiva subendotelial, con estrechamiento u obliteración de la luz)<sup>4</sup>, angiogénesis (formación de nuevos vasos sanguíneos)<sup>4</sup>, y vasodilatación<sup>3</sup>. La angiogénesis y la vasodilatación podrían ser mecanismos compensatorios frente al exceso de

matriz y fibrosis y la aparición de nuevas células, para favorecer el aporte de oxígeno y nutrientes a las mismas. Tanto las nuevas células que acuden a la MP como las mesoteliales que sufren EMT, y otras células residentes como macrófagos tisulares y células endoteliales, producen además factores de crecimiento y citoquinas que favorecen estos cambios vasculares (como el VEGF, del inglés, Vascular Endothelial Growth Factor, factor de crecimiento del endotelio vascular)<sup>35-36</sup>. Por tanto, estos procesos están interrelacionados y dan lugar a un incremento de la superficie efectiva de transporte en la MP, por lo que aumenta la absorción del agente osmótico y disminuye su gradiente, lo que culmina con el **fracaso** de la capacidad de **ultrafiltración** (UFF, del inglés, Ultra-Filtration Failure)<sup>6</sup>. Ésta es una gran complicación para la DP, dado que obliga al paciente a abandonar el tratamiento y someterse a otras alternativas terapéuticas.

Sin embargo, qué desencadena este conjunto de eventos es una cuestión que aún no está completamente clara. Sabemos que, esporádicamente, muchos pacientes de DP sufren episodios agudos de peritonitis. Estos episodios pueden deberse a infección o hemoperitoneo y agravan el daño a la MP, acelerando la aparición de la fibrosis y la angiogénesis que culminan con el UFF<sup>1</sup>.

### II.3 Episodios de peritonitis agudas y su repercusión en diálisis peritoneal

Durante estos episodios, las células del sistema inmune son atraídas a la cavidad peritoneal causando un infiltrado inflamatorio intenso y agudo. Los polimorfonucleares (PMNs) llegan poco tiempo después del estímulo inflamatorio<sup>37</sup>, y, debido a los procesos enzimáticos que desarrollan, contribuyen al daño en la MP. Sus porcentajes aumentan muy rápidamente en respuesta a la infección, alcanzando casi el 84% del total de células presentes según un estudio de Ganguly *et al.*<sup>38</sup>. Seguidamente llegan las células T y los macrófagos que eliminan detritos celulares y cuerpos apoptóticos<sup>39</sup> (Figura 4).



Con respecto a las T **CD4<sup>+</sup>** (T helper), éstas pueden clasificarse según su fenotipo en varios subtipos: en términos generales, los linfocitos Th1 producen altos niveles de IFN- $\gamma$ ,

esencial para la activación de macrófagos<sup>40</sup>, y también IL-2, y son los efectores de la inmunidad celular. Las células Th2 secretan mayoritariamente IL-4, promoviendo la función de las células B, y también otras como IL-5 e IL-10<sup>41</sup> (respecto a citoquinas, ver Tabla 2). Estudios realizados durante episodios de peritonitis agudas en pacientes de DP ambulatoria continua sugieren la aparición de una respuesta inmunitaria predominantemente de tipo Th1, caracterizada por la inducción rápida de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ <sup>42</sup>, IL-12 e IL-18, seguidas de un aumento de IFN- $\gamma$ <sup>43</sup>. Glik y Douvdevani interpretan de este dato que la polarización a Th1 de las células T peritoneales puede mejorar la cooperación entre células T, macrófagos peritoneales y PMNs, dado que las Th1 producen grandes cantidades de IFN- $\gamma$ , que puede incrementar la actividad de estos tipos celulares<sup>44</sup>. Parece además que este fenotipo Th1 está implicado en el desarrollo de adherencias<sup>45</sup>.

En la medida en que el proceso inflamatorio persiste o es recurrente, el daño de la MP aumenta, desencadenando un proceso de reparación intenso con una regeneración tisular anómala. Esto puede explicar por qué pacientes que sufren peritonitis agudas recurrentes (infecciosas o por hemoperitoneos) tienen acelerado el proceso de pérdida de función peritoneal, pero no explica el hecho de que los pacientes que no hayan tenido problemas de peritonitis agudas también desarrollan estas alteraciones morfofuncionales.

#### II.4 Cambios peritoneales en DP en ausencia de peritonitis agudas.

Distintos estudios han comprobado que la uremia *per se* es causa de cambios en el estado inflamatorio a nivel sistémico. Recientemente, Zhang y cols. han comprobado que los pacientes urémicos tienen incrementadas las células Th17 circulantes, subtipo de células T CD4<sup>+</sup>, así como las citoquinas proinflamatorias más relacionadas con estas células (IL-17, IL-6 e IL-23) (tabla 2)<sup>46</sup>. Además este mismo grupo ha observado que otro subtipo de células T, las T reguladoras (Treg), disminuyen en número en uremia en comparación con pacientes sanos, al tiempo que disminuyen también citoquinas producidas por ellas como IL-10 (tabla 2) y TGF- $\beta$ <sup>46</sup>. Es sabido que las células T reguladoras pueden subdividirse en constitutivas, que expresan el factor de transcripción Foxp3 durante su desarrollo en el timo, e inducibles, que se desarrollan en la periferia y pueden expresar o no FoxP3. Dentro de las FoxP3<sup>+</sup>, las mejor caracterizadas son las de tipo 1 (Tr1), las cuales producen IL-10 en concentraciones muy elevadas y es crítico para su función reguladora (revisado en Maynard *et al*, 2008<sup>47</sup>). Otro tipo de Treg son las llamadas Th3, las cuales producen preferentemente TGF- $\beta$ <sup>44</sup>. La disminución de IL-10 asociada a un menor número de células T reguladoras observada en uremia podría repercutir en la formación de fibrosis, como sugiere el trabajo de Lietchy y cols.<sup>48</sup>, y por tanto en un mayor engrosamiento de la membrana peritoneal.

En ausencia de peritonitis infecciosas y hemoperitoneos, estudios previos demuestran que los pacientes en DP tienen también porcentajes de células inflamatorias en el peritoneo distintos a los individuos sanos. De hecho, Lewis *et al.* sugerían en 1993 la existencia de “cierto grado de activación local continua en el peritoneo de pacientes de DP, incluso en ausencia de evidencias clínicas de infección”, puesto que en estudios anteriores se había observado ya que el porcentaje de **linfocitos** en el peritoneo aumenta en DP, principalmente durante el primer mes<sup>49</sup>. Por otra parte, distintos autores encuentran modificaciones en el ratio CD4:CD8 en el peritoneo de pacientes en DP con respecto a individuos sanos<sup>50-51</sup>. Existe cierta controversia sobre el patrón de respuesta que se genera en individuos sometidos a tratamiento con LD. Se ha descrito que existe una desviación hacia un patrón Th2 en pacientes estables de DP<sup>52</sup>. Sin embargo, estudios recientes sugieren la presencia de células T memoria residentes en el peritoneo capaces de desarrollar una respuesta de tipo Th1 (vía producción de IFN- $\gamma$ ), como demuestran mediante estimulación policlonal de células T purificadas del peritoneo<sup>53</sup>. Otro estudio señala la existencia de células T reguladoras en la cavidad peritoneal expuesta a LD<sup>54</sup>.

Con respecto a los linfocitos B, distintos estudios muestran que éstos disminuyen a partir del primer/segundo año en DP<sup>50-51</sup>. Una subpoblación de células B, las B1 (subtipo de B mayoritario en la cavidad peritoneal<sup>55</sup>) puede modular la actividad fagocítica de los macrófagos *in vitro* mediante la secreción de IL-10<sup>56</sup>.

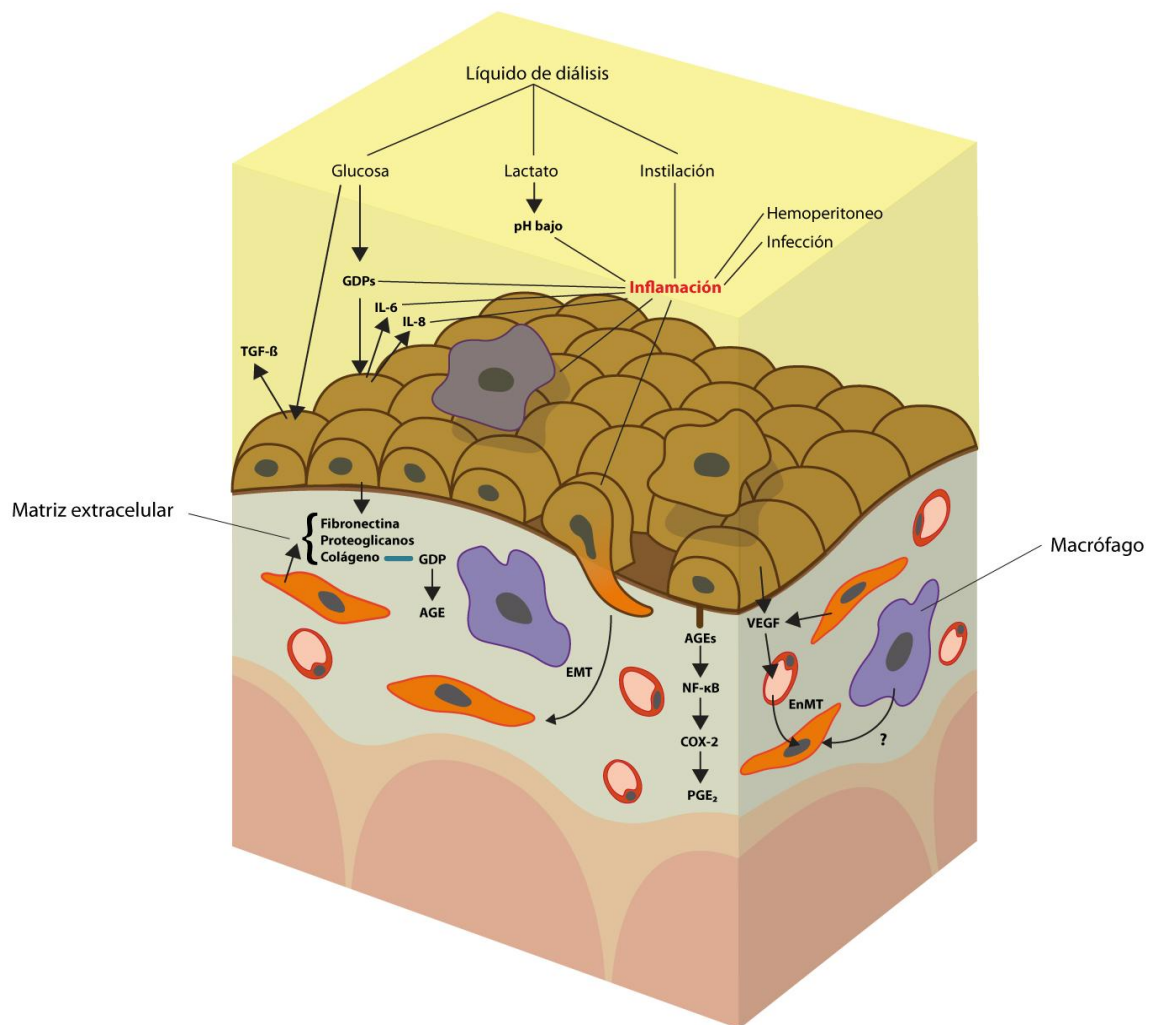
Por su parte, los macrófagos constituyen la población externa más abundante en el peritoneo de pacientes en DP. El porcentaje de macrófagos drenados también aumenta con la DP<sup>57</sup>. En el estudio realizado por Ganguly *et al.* en 1980, se observa que los pacientes estables en DP drenan en sus lavados peritoneales un 72% de macrófagos, 14% de linfocitos y 14% de PMN<sup>38</sup>.

Las concentraciones en el efluente de moléculas secretables implicadas en la inflamación también cambian durante los tratamientos de DP en ausencia de peritonitis/hemoperitoneos. Se ha observado que durante el primer año de DP en pacientes tratados con LD con glucosa como agente osmótico, la producción de IL-6 aumenta a nivel sistémico e intraperitoneal<sup>58</sup>. En efluente de DP humano hay más IL-6 que en plasma en condiciones estables, lo que sugiere producción local<sup>58</sup>. Además, las alteraciones en el sistema de la IL-6 están fuertemente asociadas con alteraciones en la tasa de transporte de solutos y esto puede también ser, al menos en parte, responsable del UFF. Esta tasa de transporte para solutos grandes y pequeños está unida a nivel basal, pero desconectada tras un año en DP. Es curioso que esta idea de la inflamación peritoneal y su relación con cambios en la permeabilidad de la MP se manejaba ya a principios del siglo XX, en los comienzos de los primeros estudios experimentales sobre el peritoneo como posible membrana de diálisis. Fleischer afirmaba que el peritoneo, como

membrana biológica que es, puede inflamarse, lo que aumentaría drásticamente su permeabilidad, permitiendo el paso de moléculas proteicas más grandes (revisado en Montenegro *et al.*, 2009<sup>59</sup>).

## II.5. Bioincompatibilidad de las soluciones de DP

Pese a todos los conocimientos citados anteriormente, no existen hasta ahora estudios globales más en profundidad del desarrollo y la repercusión de este estado inflamatorio continuo asociado a la DP en la fibrosis peritoneal, fuera del contexto de la peritonitis aguda. La causa principal de la generación de inflamación es la bioincompatibilidad de los LD, por varios motivos que se resumen a continuación.



**Figura 5.-** Esquema de las principales alteraciones promovidas por la composición del LD generadas en la MP durante la DP. Angiogénesis, aparición de más células fibroblastoides, producción de ECM y secreción de factores relacionados con inflamación.

Entre los factores que influyen directamente en la bioincompatibilidad hay que destacar que la gran mayoría de LD utilizan la **glucosa** como agente osmótico y, para generar un gradiente, su concentración debe superar de 15 a 40 veces las concentraciones fisiológicas, manteniéndose

incluso de 6 a 16 veces superiores tras el equilibrado intraperitoneal<sup>26</sup>. El mesotelio supone la primera línea de contacto del líquido con el organismo. Se ha comprobado *in vitro* que altas concentraciones de glucosa en CM humanas (HPMCs, del inglés, Human Peritoneal Mesothelial Cells) inducen la síntesis de TGF- $\beta$  (del inglés, Transforming Growth Factor beta), factor implicado en fibrosis (ver tabla 2), y fibronectina, componente de la ECM<sup>60</sup> (Figura 5). Además la exposición de las HPMC a glucosa provoca fenómenos de apoptosis y oncosis<sup>61</sup>, favoreciendo que algunas de estas células se desprendan de la membrana (Figura 5).

Otro motivo por el cual la composición de los LD está ligada a las lesiones peritoneales es que su esterilización se realiza convencionalmente por calor, lo que origina productos de degradación de la glucosa (**GDPs**, “Glucose Degradation Products”). Estos GDPs activan a una amplia variedad de células, induciendo procesos de inflamación y apoptosis<sup>62</sup>. Por ejemplo, la exposición de las CM a GDPs da lugar a un aumento de la producción de determinadas citoquinas proinflamatorias, como IL-6 e IL-8<sup>62</sup> (tabla 2), incremento del factor proangiogénico VEGF<sup>63-64</sup> (Figura 5), aumento de la expresión de VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular) y una inhibición del crecimiento celular e inducción de apoptosis<sup>61-62</sup>.

Otro factor que influye en la bioincompatibilidad del LD es que los GDPs a su vez promueven la formación de los llamados productos de Amadori y productos de glucosilación avanzada (**AGEs**, por Advanced Glycosylation End-products)<sup>65</sup>. En condiciones fisiológicas la aparición de estos compuestos está determinada por la concentración de azúcares reductores y por el tiempo de exposición de las proteínas a los mismos (vida media de la proteína). En proteínas de recambio rápido, el proceso de glucosilación no enzimática no supera, en general, las etapas iniciales, mientras que las de vida media larga, al cabo de varios meses o incluso años de contacto con glucosa, originan AGEs<sup>65</sup>, como por ejemplo el colágeno<sup>66</sup> (Figura 5). A diferencia de las etapas iniciales, que son reversibles, la etapa final de la glucosilación de proteínas es un proceso fuertemente desplazado hacia la formación de productos. Las fibras de colágeno glucosiladas son menos solubles y más resistentes a la degradación que el colágeno normal, y esta diferencia puede dar lugar a la acumulación de ECM en la capa submesotelial<sup>32</sup>. Se ha postulado que la presencia de AGEs sea responsable de un aumento en la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup> (también llamados linfocitos T citotóxicos) (Figura 6), que reconocerían las proteínas de membrana celular glicosiladas como antígenos extraños<sup>44</sup>.

Muchos de los efectos deletéreos de los AGEs serían mediados por la unión a moléculas localizadas en la superficie de células presentes en el peritoneo. El receptor para AGEs (RAGE) está presente por ejemplo en células endoteliales, macrófagos, fibroblastos y HPMC<sup>67-69</sup>. Existen evidencias que indican que la EMT está mediada por RAGE<sup>70</sup>. Las CM conforman el epitelio que recubre la superficie del peritoneo. Por ello, al igual que sucede durante la fase de regeneración en



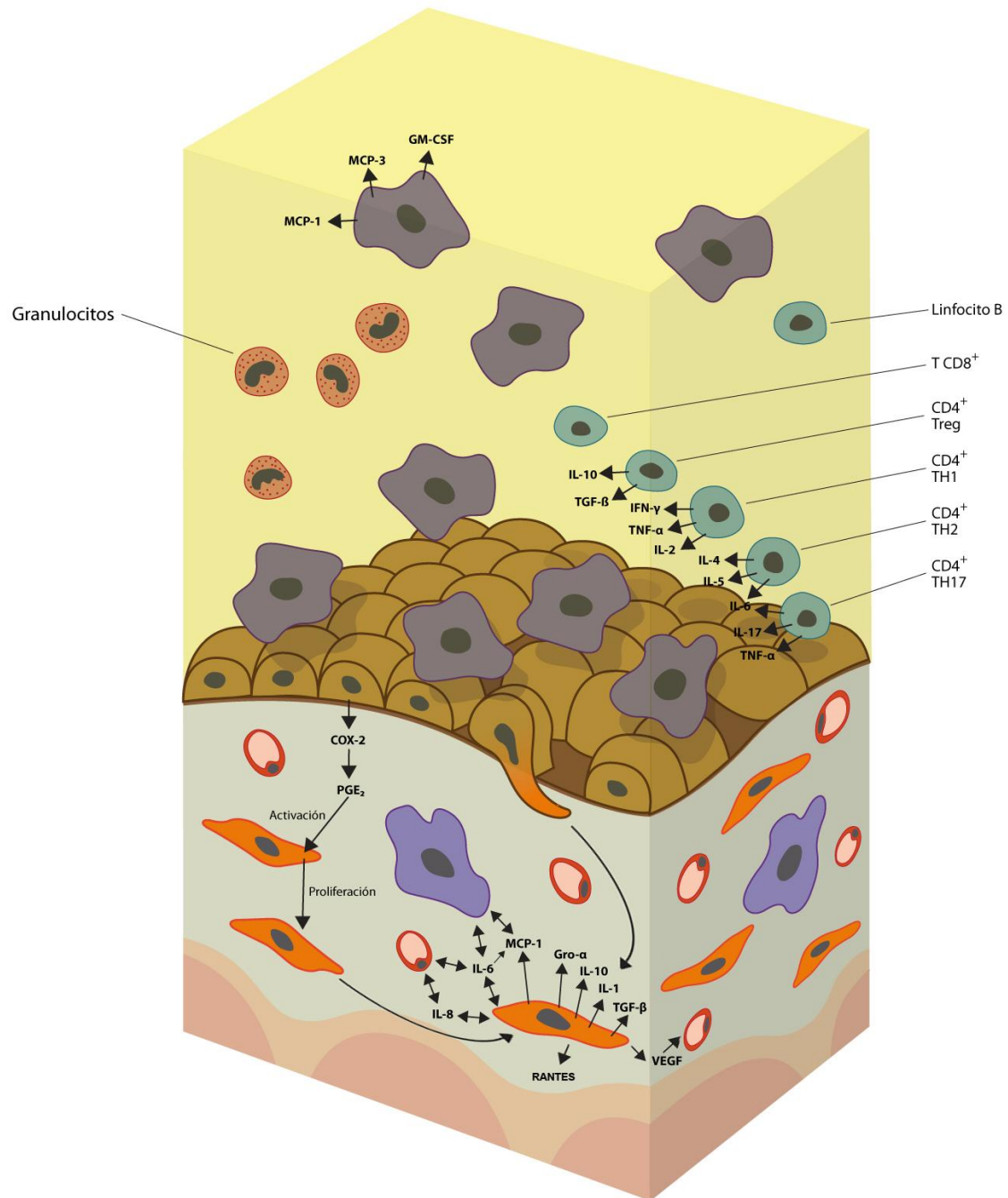
cualquier tejido tras un daño, ante el estímulo que genera el daño producido por el LD, las CM pueden sufrir EMT adquiriendo características fibroblastoides, modificando el patrón de expresión de moléculas implicadas en la producción de ECM<sup>71</sup> y aumentando la secreción de VEGF<sup>72</sup> (Figura 6). Además, responden a las citoquinas secretadas por las células del sistema inmunológico secretando a su vez citoquinas y quimioquinas tales como IL-8, Gro- $\alpha$ , MCP-1, IL-1, IL-6, IL-10, TGF- $\beta$  y RANTES (CCL5)<sup>35,73,74-75,76</sup> (Figura 6) (tabla 2). Las CM cultivadas con TGF- $\beta$  o TGF- $\beta$  más IL-1 sufren EMT<sup>71</sup>. La EMT ocurre *in vivo* únicamente durante el desarrollo embrionario y en procesos patológicos como la cicatrización de heridas y la progresión tumoral<sup>77-78</sup>. Los fibroblastos residentes pueden secretar también estos factores en respuesta a AGEs, glucosa, o GDPs<sup>69,79</sup>.

La unión de los AGEs a RAGEs desencadena la generación de radicales libres de oxígeno, que inducen procesos inflamatorios. El trabajo de Schwenger *et al.* con ratones deficientes en RAGE sugiere que la activación de las células T puede estar mediada por la unión del ligando al RAGE<sup>80</sup>. La unión al RAGE induce múltiples cascadas de señalización celular como la activación de MAP-quinasas (MAPKs)<sup>81</sup> y la activación de rutas de transducción de señal como la del NF- $\kappa$ B (factor de transcripción nuclear kappa B)<sup>67</sup> (Figura 5). Por ejemplo, la ruta de señalización para la activación de integrinas (moléculas de adhesión) es dependiente de MAPKs<sup>82</sup>. El NF- $\kappa$ B es esencial en enfermedades inflamatorias y en respuesta inmune crónica<sup>83</sup>. Participa en daño vascular mediante la regulación de varios genes, incluyendo moléculas de adhesión, citoquinas, quimioquinas, angiotensinógeno, y otros más relacionados con proliferación y respuesta inmune<sup>83</sup>. Así por ejemplo, se ha visto que la inhibición de NF- $\kappa$ B suprime el desarrollo de lesiones ateroscleróticas mediante la prevención de la inflamación, la proliferación de células vasculares de músculo liso y apoptosis<sup>83-85</sup>.

Además, Shanmugan *et al.* observaron que los AGEs inducen la expresión de ciclooxigenasa (COX)-2 y la secreción de prostaglandina (PG) E<sub>2</sub> en monocitos humanos de sangre periférica, mediante la activación de las rutas dependientes de NF- $\kappa$ B y p38<sup>86</sup>. La COX es una enzima que cataliza la síntesis de PGs mediante la oxidación del ácido araquidónico<sup>7</sup>. Existen dos isoformas de esta enzima: mientras COX-1 es constitutiva y se expresa en diversos tejidos, la expresión de COX-2 está regulada por estímulos mitogénicos, inflamatorios y prooncogénicos, y está relacionada con procesos patológicos, incluyendo la respuesta inflamatoria, mitogénesis, angiogénesis y progresión de tumores<sup>7</sup>. Además, COX-2 media la expresión de TGF- $\beta$ , fibronectina y VEGF en el riñón en un modelo de diabetes e hipertensión en rata<sup>87</sup>. Más aún, se ha comprobado también que altas concentraciones de glucosa incrementan la síntesis de PGE<sub>2</sub> en HPMCs<sup>88</sup>. Los medicamentos anti-inflamatorios más comunes se basan en la inhibición de la COX para ejercer su función. Por ejemplo, el Ibuprofeno, que pertenece al grupo de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) o la aspirina, inhiben ambas isoformas<sup>89</sup>.

Otra posible causa de daño peritoneal en relación con la composición del LD es que, para evitar en lo posible la degradación del azúcar durante la esterilización del líquido, se utiliza un **pH** bajo, no fisiológico, que también podría estar provocando una irritación. Sin embargo esta hipótesis no ha sido confirmada y existen argumentos en contra<sup>90</sup>. De hecho, se ha sugerido que el lactato en sí sea causante de daños, y no el pH<sup>91</sup>.

Por último, es posible que la instilación del líquido en la cavidad peritoneal cause *per se* **descamación** de células de la membrana peritoneal por daño mecánico.



**Figura 6.-** Inflamación crónica. Esquema simplificado de las células inflamatorias y principales citoquinas y quimioquinas relacionadas con los fenómenos inflamatorios que han sido descritos en DP.

En conjunto, el alto poder osmótico, la glucosa y sus productos de degradación, el bajo pH, y el proceso mecánico de introducir y retirar el LD, están relacionados con la generación y el mantenimiento de un proceso inflamatorio. Por tanto, la composición de los LD hace de la DP un proceso bioincompatible capaz de producir daño a la cavidad peritoneal<sup>64,92-93</sup>.

Existen en el mercado nuevos líquidos que tratan de corregir todos los problemas comentados mediante la utilización de diferentes agentes osmóticos, empleando otras técnicas de esterilización o manteniendo un pH más cercano al fisiológico (usando varias cámaras aisladas que se mezclan en el momento de su utilización), pero incluso así no se ha encontrado aún una solución definitiva que evite los daños en el peritoneo que llevan a la fibrosis y en último término al UFF (tabla 1).

|           | SOLUCIÓN                         | BOLSA  | AGENTE OSMÓTICO                 | TAMPÓN (mmol/L)                | GDP  | pH           |
|-----------|----------------------------------|--------|---------------------------------|--------------------------------|------|--------------|
| BAXTER    | Dianeal PD1                      | Simple | Glucosa<br>1.36 - 2.27 - 3.86 % | Lactato 35                     | Alto | 5.2          |
|           | Dianeal PD4                      | Simple | Glucosa<br>1.36 - 2.27 - 3.86 % | Lactato 40                     | Alto | 5.2          |
|           | Extaneal                         | Simple | Icodextrina 7.5 %               | Lactato 40                     | No   | 5.6          |
|           | Nutrineal                        | Simple | Aminoácidos 1.1 %               | Lactato 40                     | No   | 5.5          |
|           | Physioneal 35                    | Doble  | Glucosa<br>1.36 - 2.27 - 3.86 % | Lactato 10 +<br>Bicarbonato 25 | Bajo | 7.4          |
|           | Physioneal 40                    | Doble  | Glucosa<br>1.36 - 2.27 - 3.86 % | Lactato 15 +<br>Bicarbonato 25 | Bajo | 7.4          |
| FRESENIUS | Stay Safe<br>2 - 3 - 4           | Simple | Glucosa<br>1.5 - 4.25 - 2.3 %   | Lactato 35                     | Alto | 5.5          |
|           | Stay Safe<br>17 - 18 - 19        | Simple | Glucosa<br>1.5 - 4.25 - 2.3 %   | Lactato 35                     | Alto | 5.5          |
|           | Balance<br>2 - 3 - 4             | Doble  | Glucosa<br>1.5 - 4.25 - 2.3 %   | Lactato 35                     | Bajo | 7 –<br>7.4   |
|           | Balance<br>17 - 18 - 19          | Doble  | Glucosa<br>1.5 - 4.25 - 2.3 %   | Lactato 35                     | Bajo | 7 –<br>7.4   |
|           | BicaVera<br>2 - 3 - 4            | Doble  | Glucosa<br>1.5 - 4.25 - 2.3 %   | Bicarbonato 34                 | Bajo | 7.4          |
| GAMBRO    | Gambrosol Trio 10<br>A - B - A+B | Triple | Glucosa<br>1.5 - 2.5 - 3.9 %    | Lactato 35                     | Bajo | 5.5 –<br>6.5 |
|           | Gambrosol Trio 40<br>A - B - A+B | Triple | Glucosa<br>1.5 - 2.5 - 3.9 %    | Lactato<br>41 - 40 - 39        | Bajo | 5.5 –<br>6.5 |

**Tabla 1.-** Composición de los distintos LD utilizados actualmente en la práctica clínica en DP.

Por tanto, podemos inferir de todo esto que el LD podría generar una inflamación en el peritoneo independiente de infecciones o hemoperitoneos; con producción de quimioquinas que generan un reclutamiento de células inmunológicas a la cavidad peritoneal, y citoquinas que

promueven la aparición de cambios (tanto morfológicos como de expresión proteica) en las células presentes. Todos los componentes de la MP participarían activamente en diferentes grados en el proceso. Este conjunto de cambios resulta en daños al peritoneo que concluyen con UFF.

## II.6. Factores que intervienen en el reclutamiento y la activación celular

Todas las células presentes tanto en la cavidad peritoneal como en la MP producen una amplia variedad de factores de crecimiento, citoquinas y quimioquinas que están interrelacionadas y dirigen la respuesta inflamatoria. En la tabla 2 se muestra una relación de las citoquinas y quimioquinas más relevantes para este estudio.

|               | SECRETADA POR  | FUNCIÓN   |
|---------------|--|---|
| IL-1 $\alpha$ | Monocitos y otros tipos celulares <sup>94</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Proinflamatoria. Activa COX-2<sup>94</sup></li> </ul>  |
| IL-2          | Células T <sup>95</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Activación de células T, monocitos y células B<sup>95</sup></li> <li>Proliferación de células T<sup>95-96</sup></li> </ul>   |
| IL-4          | Células Th2 principalmente <sup>96</sup>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Profibrótica<sup>97</sup></li> <li>División y diferenciación de células T y B<sup>95</sup></li> <li>Estimula quimiotaxis, proliferación, expresión de <math>\alpha</math>-sma y síntesis de fibronectina en fibroblastos<sup>98</sup></li> </ul>   |
| IL-5          | Células Th2 <sup>95-96</sup>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>Diferenciación de células B en ratón<sup>95</sup></li> <li>Incrementa Th2<sup>96</sup></li> </ul>  |
| IL-6          | Monocitos/macrófagos, células T, B, fibroblastos, neutrófilos adipocitos y endoteliales en respuesta a varios estímulos, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , endotoxinas bacterianas y estrés oxidativo <sup>58,95-96,98</sup> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Promueve inflamación mediante inducción de MCP-1<sup>99</sup></li> <li>Activa a monocitos y macrófagos</li> <li>formación de cicatrices en heridas fetales tras aplicación exógena de IL-6<sup>48</sup></li> <li>activación y proliferación de linfocitos T<sup>96,100</sup></li> <li>diferenciación de células B<sup>100</sup></li> <li>reclutamiento de leucocitos<sup>100</sup>.</li> <li>Proliferación de fibroblastos y angiogénesis a nivel local.</li> </ul>  |
| IL-8, CXCL-8  | Monocitos estimulados, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales <sup>95-96</sup>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>reclutamiento y activación de neutrófilos, los cuales generan metabolitos tóxicos de oxígeno<sup>95-96</sup></li> <li>Proliferación de fibroblastos y angiogénesis a nivel local.</li> <li>Promueve la expresión de moléculas de adhesión.</li> </ul>  |
| IL-10         | Th2, monocitos, células B, Tregs, Th17 y otras poblaciones celulares <sup>47,98,101-102</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Anti-inflamatoria.</li> <li>Reduce la expresión de ICAM-1<sup>47</sup>.</li> <li>Disminuye la producción de IL-6 e IL-8<sup>103</sup></li> <li>Heridas en injertos de piel fetal de ratones knock-out para IL-10 muestran inflamación y formación de cicatrices<sup>48</sup>.</li> <li>Inhibe la actividad de NF-<math>\kappa</math>b<sup>48</sup>.</li> <li>Un aumento de IL-6 e IL-8 como consecuencia de una deficiencia de IL-10 genera más células en la herida, más citoquinas secretadas, proliferación celular y producción de ECM por los fibroblastos<sup>48</sup>.</li> </ul> |

|                        |   |   |
|------------------------|---|---|
| <b>IL-17</b>           | Células Th17  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Potente mediador proinflamatorio. Induce liberación de IL-6, IL-8 y GM-CSF<sup>96</sup></li> <li>▪ Correlacionada con enfermedades fibro-proliferativas causadas por infección<sup>104-105</sup>, autoinmunidad<sup>106</sup>, drogas<sup>107</sup> y rechazo a trasplantes<sup>108-109</sup>.</li> <li>▪ Producción local asociada con formación de queloides en personas con susceptibilidad<sup>110</sup>.</li> </ul>                       |
| <b>MCP-1, CCL2</b>     | Células mesoteliales <sup>111-113</sup> , fibroblastos, células endoteliales, epiteliales, monocitos/macrófagos y células tumorales <sup>98</sup> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Reclutamiento y activación de monocitos<sup>114</sup> y células T<sup>98,115</sup></li> <li>▪ Inducida en diversos modelos de fibrosis<sup>116-118</sup>.</li> <li>▪ Papel importante en reparación de heridas, mediando reclutamiento de células inflamatorias e influenciando sobre formación de tejido y cierre de la herida.</li> <li>▪ Ratones deficientes en MCP-1 tienen un retraso en la reparación fibrótica<sup>119</sup></li> </ul> |
| <b>RANTES</b>          | Células T <sup>120</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Atrae selectivamente a linfocitos T y monocitos.</li> <li>▪ Activador de células T, monocitos, neutrófilos y NK</li> </ul>   |
| <b>MCP-3</b>           | Monocitos activados <sup>121</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activador de leucocitos.</li> <li>▪ Atrae monocitos y linfocitos T<sup>115</sup></li> <li>▪ Implicado en modelos de fibrosis<sup>121</sup></li> </ul>  |
| <b>MIP-1α Y MIP-1β</b> | Monocitos, macrófagos, mastocitos, fibroblastos y linfocitos T <sup>122</sup>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Quimioatrayentes y coactivadoras de macrófagos junto con IFN-γ.</li> <li>▪ Reclutamiento de neutrófilos<sup>123</sup></li> <li>▪ MIP-1α: quimiotaxis de linfocitos B y T CD8<sup>+</sup> activados<sup>122</sup>.</li> <li>▪ MIP-1β Quimiotaxis de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados<sup>122</sup></li> <li>▪ Ambas: estrictamente asociadas con respuesta Th1.</li> </ul>  |
| <b>GM-CSF</b>          | Producida por células T activadas, macrófagos, endoteliales y fibroblastos <sup>96</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Proliferación y diferenciación de progenitores de granulocitos/macrófagos.</li> <li>▪ Modula la actividad de granulocitos y macrófagos maduros.</li> </ul>   |
| <b>IFN-γ</b>           | Células T y NK <sup>95-96</sup>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Activa macrófagos, células epiteliales y endoteliales<sup>96</sup></li> <li>▪ Promueve adhesión para la migración de leucocitos<sup>98</sup></li> <li>▪ Inhibe producción de colágeno in vitro y expresión de α-sma<sup>98</sup></li> </ul>  |
| <b>TNF-α</b>           | Macrófagos, pero también otras como células linfoides <sup>98</sup> , endoteliales, tejido adiposo o fibroblastos                                 | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Potente quimioatrayente de neutrófilos</li> <li>▪ Estimulador de macrófagos, células epiteliales y endoteliales<sup>96</sup></li> <li>▪ Citoquina Th1<sup>98</sup></li> <li>▪ Profibrótica o antifibrótica dependiendo del modelo<sup>98</sup></li> </ul>  |
| <b>TGF-β</b>           | Fibroblastos, células inmunológicas, sobre todo macrófagos <sup>97,124</sup>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Regula formación de ECM, crecimiento celular, migración, adhesión, apoptosis<sup>125-126</sup>.</li> <li>▪ pro- o anti- inflamatorio dependiendo de otras moléculas acompañantes<sup>127</sup>. TGFβ1 es profibrótico mientras TGFβ2 y 3 son anti-fibróticos<sup>128</sup></li> </ul>  |

*Tabla 2.- Funciones generales de las citoquinas y quimioquinas presentes en el efluente de diálisis relacionadas con este estudio.*

En resumen, el conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de trauma y reparación de la membrana peritoneal expuesta al LD puede contribuir al desarrollo de nuevos líquidos y terapias capaces de prevenir o retardar la pérdida de la función peritoneal. Por ello, en este estudio analizamos la existencia de una inflamación crónica asintomática sostenida en el peritoneo, causada por la exposición a LD, y caracterizamos su progresión a lo largo del tiempo. Además, estudiamos su influencia sobre el desarrollo de la fibrosis y el engrosamiento peritoneal que desencadena el UFF, así como las posibilidades terapéuticas disponibles para paliarlo.



### **III. HIPÓTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO**





### III.1. HIPÓTESIS:

Nuestra hipótesis es que la inflamación crónica del peritoneo, provocada por el líquido de diálisis, genera fibrosis y ocasiona fallo de ultrafiltración. Su modulación puede ser suficiente para evitar o retardar el deterioro de la membrana peritoneal.

### III.2. OBJETIVOS:

- 1.- Diseñar y desarrollar un modelo *in vivo* para el estudio de la exposición de la membrana peritoneal al líquido de diálisis.
- 2.- Caracterizar la progresión de la inflamación causada por la exposición del peritoneo al líquido de diálisis.
- 3.- Analizar el efecto de la inhibición o modulación de la inflamación en el daño peritoneal. Estudiar la potencialidad de la inflamación como diana terapéutica.



## **IV. RESULTADOS**



## **IV.1.- Diseño y desarrollo de un modelo *in vivo* para el estudio de la exposición de la membrana peritoneal al líquido de diálisis.**

- **IV.1.1.- Elección del modelo de experimentación: *Apartados IV.1.1.1 y IV.1.1.2***

Estudios previos en DP indican que las alteraciones morfofuncionales que sufre el peritoneo son consecuencia de la exposición reiterada a LD bioincompatibles. Por tanto, la solución ideal pasaría por el desarrollo de líquidos biocompatibles, pero que conservaran su capacidad dializante. Los LD disponibles actualmente, desarrollados con el fin de lograr una mayor biocompatibilidad, siguen ocasionando daños en la MP. Por consiguiente, el origen del problema no está resuelto. Nosotros consideramos que dicho origen se encuentra en el desarrollo de un proceso inflamatorio.

Para estudiar la relevancia de la inflamación en la progresión de los daños peritoneales en DP, es necesario analizar tanto la MP como el efluente drenado. La obtención de biopsias de pacientes es un procedimiento invasivo, lo que complica el estudio de distintas etapas controladas del proceso. Además, la variabilidad de respuesta entre pacientes es amplia, por lo que debe realizarse un seguimiento individual, inviable mediante éste método. Podrían usarse efluentes para el estudio de células drenadas (tanto aquellas que se descaman de la MP como las que acuden en respuesta a determinados estímulos) y factores solubles, pero no podrían correlacionarse estos datos con biopsias. Los ensayos en animales permiten aunar estos métodos. El uso de animales de laboratorio posee la gran ventaja de controlar el fondo genético, de modo que sea idéntico en todos los sujetos del estudio, eliminando el problema de variabilidad presente en humanos. Sin embargo los modelos animales existentes no permitían el desarrollo de este estudio. En este apartado se discute la necesidad de creación de un modelo experimental. Asimismo, se sintetiza la evolución de su desarrollo, el procedimiento quirúrgico y diseño de los catéteres. El catéter empleado para los experimentos contenidos en los siguientes capítulos de esta tesis ha sido desarrollado a medida y optimizado tras la evaluación de distintos prototipos. En el capítulo II se discute la importancia de decidir la cepa con la que trabajar y otros aspectos como la vía de instilación del líquido, volumen, frecuencia y tiempo de exposición. Se explica además qué tipo de tejido se analiza y la zona de la que se extrae, dado que los resultados pueden variar dependiendo de la muestra analizada. Por otra parte, los estudios de biocompatibilidad de LD deben tener en cuenta las diferencias metabólicas interespecíficas. Todas estas decisiones afectan al resultado del estudio. Así, este capítulo explica las razones que determinan los materiales y métodos utilizados en este trabajo.

➤ **IV.1.1.1.- Modelos animales de DP: relevancia, dificultades y futuro.**<http://www.senefro.org>

© 2008 Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nefrología

**Suplemento**

## Modelos animales de diálisis peritoneal: relevancia, dificultades y futuro

G. T. González-Mateo<sup>1</sup>, J. Loureiro-Álvarez<sup>2</sup>, S. Rayego-Mateos<sup>3</sup>, M. Ruiz-Ortega<sup>3</sup>, M. López-Cabrera<sup>1</sup>, R. Selgas<sup>1</sup> y L. S. Aroeira<sup>1</sup><sup>1</sup>Unidad de Investigación y Servicio de Nefrología. Hospital Universitario La Paz. <sup>2</sup>Unidad de Biología Molecular. Hospital Universitario de La Princesa. <sup>3</sup>Laboratorio de Biología Celular en Enfermedades Renales. Universidad Autónoma de Madrid. Red Española de Investigación Renal. Instituto Carlos III de Salud. RETICS 06/0016.

### RESUMEN

Los estudios realizados en biopsias peritoneales de pacientes con fallo renal que son tratados mediante diálisis peritoneal (DP) han demostrado que esta terapia provoca daños en la membrana peritoneal, caracterizados por fibrosis y angiogénesis, y que culminan en la pérdida de la capacidad de ultrafiltración de la membrana peritoneal. Estos estudios son descriptivos y apenas han contribuido al conocimiento de los mecanismos implicados en el proceso patológico inducido por la exposición de la membrana peritoneal a los líquidos de diálisis. Así, es necesario el desarrollo de modelos experimentales en animales para suplir las deficiencias presentadas por los estudios en pacientes. Aquí tratamos las ventajas y dificultades de la utilización de modelos experimentales de diálisis peritoneal y las expectativas para el futuro.

**Palabras clave:** Diálisis peritoneal. Deterioro de la membrana peritoneal. Ultrafiltración. Modelos experimentales de diálisis peritoneal.

### SUMMARY

The studies performed with human peritoneal biopsies of peritoneal dialysis-patients have demonstrated that exposure to peritoneal dialysis fluid induce peritoneal deterioration. The main alterations of peritoneal membrane are fibrosis and angiogenesis that ends with the failure of the ultrafiltration capacity of the peritoneal membrane. These studies are descriptivist and scarcely help to investigate the mechanisms and stages involved on the process. Therefore, it is necessary to supply the deficiencies presented by the studies with patients. The experimental models have strongly contributed to the knowledge of the pathologic process that is induced by the continuous exposition of the peritoneal membrane to the dialysis fluids. Most of the peritoneal dialysis studies use the rat as the experimental animal. Due to the difficulty of working with small animals, few studies have been done in mice. However, models in mice offers great advantages, as long as they allow us to employ different strains and genetically modified animals. We have recently developed an experimental model in mouse of exposure of the peritoneal membrane to dialysis fluids, which resembles the process of peritoneal damage that take place during peritoneal dialysis treatment in human patients.

**Key words:** Peritoneal dialysis. Ultrafiltration. Peritoneal membrane. Peritoneal dialysis experimental models.

### INTRODUCCIÓN

La diálisis peritoneal es una terapia sustitutiva del riñón, donde la membrana peritoneal es utilizada como membrana permeable. Esta técnica consiste en administrar en la cavidad peritoneal un gran volumen de líquido hiper-osmótico. Éste forma un gradiente osmótico a través de la membrana peritoneal, drenando de la sangre el exceso de líquido y metabolitos. Después de un período de cuatro a ocho horas el líquido peritoneal es drenado y nuevo líquido es introducido. Los pacientes sometidos a este tratamiento tienen la ventaja de poder llevar una vida activa, sin la necesidad de ir al hospital frecuentemente. Sin embargo, la exposición continua al líquido

de diálisis lleva al deterioro de la capacidad dializante de la membrana peritoneal. Las mayores complicaciones son el fallo de ultrafiltración y anomalías en el transporte de solutos, que están asociados a la fibrosis y vasculopatía<sup>1-3</sup>.

La causa de las alteraciones morfológicas y funcionales en la membrana peritoneal es atribuida a la bio-incompatibilidad de los líquidos de diálisis. Éstos en general utilizan la glucosa como agente osmótico. La esterilización del líquido de diálisis se realiza por calor a un pH bajo, que evita la caramelización del azúcar durante dicho proceso. En estas condiciones se forman productos de la degradación de la glucosa (GDPs) que activan a una amplia variedad de células, induciendo procesos de inflamación, fibrosis y apoptosis. En conjunto, el bajo pH, el alto poder osmótico, el proceso mecánico de introducir y retirar el líquido de diálisis, la glucosa y sus productos de degradación hacen de la diálisis peritoneal un proceso bioincompatible capaz de producir daño a la cavidad peritoneal<sup>4-6</sup>. En los dos últimos años todas las compañías far-

**Correspondencia:** Luiz Stark Aroeira  
Unidad de Investigación. Hospital Universitario La Paz  
Paseo de la Castellana, 261  
28046 Madrid. España  
lstark.hlpr@salud.madrid.org

macéuticas productoras de líquido de diálisis han introducido cambios en la composición de sus productos, con el fin de ganar biocompatibilidad, eliminando GDPs, reduciendo o eliminando lactato y manteniendo un pH más cercano al fisiológico. Los estudios realizados a corto plazo (6 meses) comparando los nuevos líquidos con los clásicos mediante marcadores en el efluente han demostrado un efecto beneficioso de los líquidos nuevos sobre la membrana peritoneal. Sin embargo, sorprendentemente, estos estudios mostraron que estos nuevos líquidos tienen menor capacidad de ultrafiltración que los líquidos clásicos, además de inducir una mayor expresión de procolágeno I/III y fibronectina. Ambos fenómenos son, en principio, contrarios al concepto de biocompatibilidad, porque serían consecuencia de una exacerbación de la angiogénesis o permeabilidad vascular y característicos del proceso fibrótico respectivamente. Hacen falta más estudios moleculares y celulares que permitirán conocer los efectos *in vivo* de la exposición a estas soluciones y su repercusión sobre inducción del trauma peritoneal en pacientes renales.

Además de la necesidad de estudiar el efecto de los líquidos de diálisis sobre la membrana peritoneal para mejorar su biocompatibilidad, también es necesario estudiar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la modulación de la función peritoneal y en el proceso de daño, procesos no todavía bien definidos. Mientras que en algunos pacientes la membrana peritoneal puede permanecer funcionalmente estable por varios años, en otros el daño y la pérdida de la función peritoneal ocurre rápidamente. Los factores que influyen en la velocidad de deterioro de la función peritoneal tampoco están completamente aclarados. Sin embargo, sabemos que las peritonitis recurrentes juegan un importante papel en la aceleración del proceso de daño peritoneal<sup>8</sup>. Las peritonitis pueden ser tanto de etiología infecciosa como por *hemoperitoneum*. En estas situaciones, las células del sistema inmune son atraídas a la cavidad peritoneal causando un infiltrado inflamatorio intenso y agudo. Los neutrófilos llegan poco tiempo después del estímulo inflamatorio<sup>9</sup>, y a través de las enzimas de sus lisosomas contribuyen al daño de la membrana peritoneal. Seguidamente llegan las células T y los macrófagos que resolverán la inflamación, eliminando detritos celulares y cuerpos apoptóticos<sup>10</sup>. En este momento, se inicia el proceso de reparación de la membrana peritoneal. En la medida que el proceso inflamatorio persiste o es recurrente, el daño de la membrana peritoneal aumenta, desencadenando un proceso de reparación intenso. Como ocurre en otros órganos en situación similar, la regeneración tisular puede ser anómala, con

aumento de la síntesis de matriz extracelular y factores angiogénicos que llevan a la esclerosis y pérdida de la función dializante de la membrana peritoneal. Esto puede explicar por qué pacientes que sufren peritonitis recurrentes o persistentes tienen acelerado el proceso de pérdida de función peritoneal, pero no explica el hecho de que pacientes que no hayan tenido problemas de peritonitis también desarrollan estas alteraciones morfofuncionales en algunos casos muy rápidamente. De esta forma, el conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de trauma y reparación de la membrana peritoneal expuesta al líquido de diálisis puede contribuir al desarrollo de nuevos líquidos y terapias capaces de prevenir o retardar la pérdida de la función peritoneal.

### ESTUDIO CON MUESTRAS DE PACIENTES Y SUS LIMITACIONES

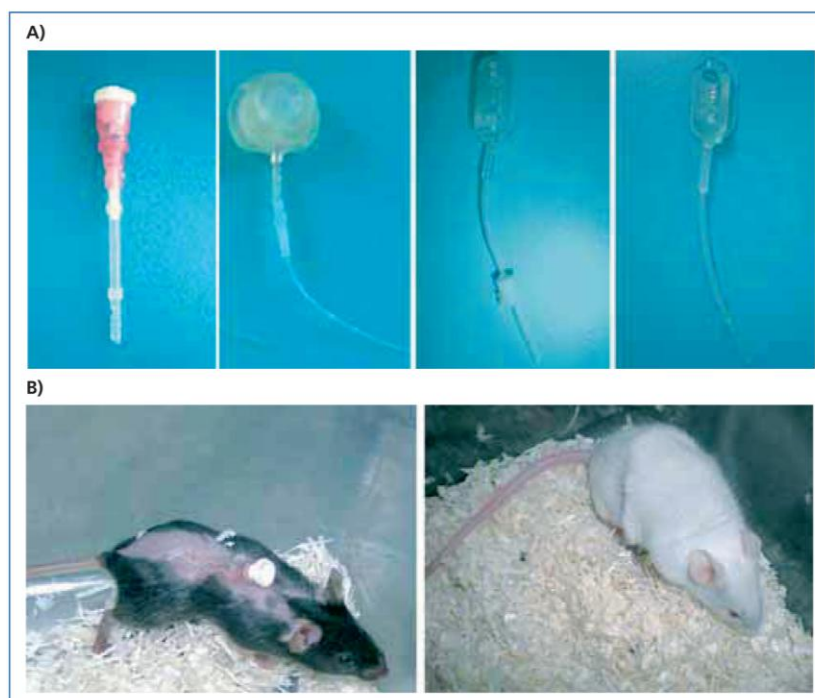
El análisis de biopsias ha proporcionado mucha información sobre el deterioro de la membrana peritoneal en pacientes en DP. En estos estudios se ha demostrado que el tratamiento del fallo renal mediante DP da lugar a fibrosis<sup>11,12</sup> y angiogénesis<sup>2,13</sup>, culminando en la pérdida de la capacidad de ultrafiltración de la membrana peritoneal. Aunque este abordaje contribuye a demostrar las consecuencias de la exposición reiterada de la membrana peritoneal al líquido de diálisis, presenta limitaciones que imposibilitan el conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso de deterioro de la membrana peritoneal. Además, como la obtención de las biopsias es un procedimiento invasivo, es muy difícil su obtención en distintos estadios del proceso de deterioro de la membrana. Así, estos estudios son de corte y pueden ser considerados como una fotografía congelada en el tiempo de un proceso que es largo y complejo, imposibilitando descubrir el mecanismo que lo desencadena.

Otra forma de estudiar el proceso de deterioro de la membrana peritoneal es estudiando el efluente de los líquidos de diálisis. Como no es una técnica invasiva, se pueden conseguir muestras a lo largo del tratamiento. Este tipo de abordaje ha ayudado a comprender el proceso de deterioro de la membrana peritoneal de una forma más dinámica, estudiando las células mesoteliales drenadas y los factores presentes en el efluente a lo largo del tiempo<sup>14,15</sup>. Asimismo, el efluente puede dar información importante sobre eventos celulares acaecidos en el tratamiento. Sin embargo, las células que se obtienen en los efluentes de diálisis, pueden no ser representativas de aquellas que están en el tejido y que realmente esta jugan-

**Tabla I. Limitaciones y ventajas de los modelos animales en el estudio de la exposición a los líquidos de diálisis**

| Diferencia entre pacientes y modelos animales de DP                                      | Consecuencia de la diferencia   |  |
|--|---|--|
|  | Limitación  | Beneficio  |
| Riñón funcional en los animales de experimentación.                                      | <ul style="list-style-type: none"> <li>No considera el efecto de la uremia.</li> <li>No se compara a los pacientes.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>Es mejor para estudiar el efecto de la exposición a los líquidos aisladamente.</li> </ul> |
| Diferencia en la velocidad de metabolismo entre pacientes y animales de experimentación. | <ul style="list-style-type: none"> <li>Tiempo de exposición al LD.</li> <li>Diferente velocidad del deterioro de la membrana peritoneal.</li> <li>Diferente velocidad de recuperación.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>Rapidez en concluir los experimentos.</li> </ul>  |





**Figura 1.** Evolución de los catéteres y del modelo de diálisis peritoneal en ratones. En A) tenemos, de izquierda a derecha, en orden del más antiguo al más reciente, los diversos catéteres que utilizamos en el modelo animal. El primero está hecho a mano, utilizando un «avocat» y un tubo de silicona. Los demás son fabricados por Access Technologies a medida. ROP fue demasiado grande para los ratones. Pennyport en dos versiones; la última ha mostrado un resultado mucho mejor. En: B) presentamos fotos de un ratón C57BL/6 con el primer catéter instalado (izquierda) y un ratón CD1 con la última versión de Pennyport (derecha).

do un papel importante en el desarrollo de las alteraciones morfofuncionales involucradas en la pérdida de la función peritoneal.

Aún así, estudiando las células mesoteliales drenadas en el líquido de diálisis cultivadas y biopsias de pacientes en diálisis, se ha demostrado que la transición epitelio mesenquimal de las células mesoteliales es uno de los importantes procesos involucrados en el daño peritoneal<sup>16</sup>. Estudios en biopsias confirmaron la presencia de células mesoteliales transdiferenciadas en el espacio sub-mesotelial embebidas en la matriz extracelular<sup>17</sup>. Estas células parecen tener un importante papel en el engrosamiento de la membrana peritoneal a través de la síntesis de matriz<sup>16</sup> y en el fallo de ultrafiltración a través de la secreción de gran cantidad de VEGF<sup>14</sup>. Este fenómeno está directamente relacionado con la función peritoneal. Sin embargo, no sabemos de forma clara por qué las células mesoteliales sufren la transición epitelio mesenquimal en respuesta a la exposición a los líquidos de diálisis y tampoco los mecanismos de este proceso.

#### LA NECESIDAD DE UN MODELO ANIMAL

Considerando las dificultades de trabajar con las muestras humanas y la necesidad de entender los mecanismos involucrados en la transición epitelio mesenquimal de las células mesoteliales y en la patogénesis de la membrana peritoneal a lo largo de la diálisis peritoneal, hace falta un buen modelo animal para abordar estos mecanismos de una forma más directa y eficiente. En el modelo animal de diálisis peritoneal, la membrana peritoneal expuesta al líquido de diálisis debe de sufrir alteraciones morfofuncionales similares a las observa-

das en los pacientes. Así, podremos reproducir toda la cinética de los eventos moleculares y celulares implicados en el deterioro de la membrana peritoneal, identificando cuáles juegan un papel crucial en el proceso. Con los modelos animales podremos testar los líquidos de diálisis, identificando las diferencias de respuesta del organismo a las diversas composiciones, ayudando así en el diseño de los nuevos líquidos. Por último, una vez identificados los eventos más importantes en el proceso de deterioro de la membrana y del fracaso de ultrafiltración, podremos desarrollar terapias capaces de prevenir, retardar o tratar el daño causado por la exposición crónica a los líquidos de diálisis. De esta forma, los modelos animales pueden suplir las deficiencias de los estudios con muestras humanas.

#### LIMITACIONES Y VENTAJAS DE LOS MODELOS ANIMALES DE DP

Algunas cuestiones deben ser consideradas en los modelos experimentales de DP disponibles, para entender mejor y ayudar a extrapolar los resultados a los pacientes.

1. La primera limitación de la gran mayoría de los modelos animales de diálisis peritoneal es que los animales utilizados en la experimentación tienen el riñón funcional y el líquido de diálisis instilado es eliminado por la orina. Para ser considerado un modelo de diálisis peritoneal, los animales deberían ser urémicos, y el líquido de diálisis debería ser instilado y drenado diversas veces al día para hacer el papel del riñón. Sin embargo, esto implicaría mantener al animal sedado durante la extracción del líquido, método que podría interferir en los resultados. Por lo tanto, la mayoría de los modelos disponibles

Tabla II. Diálisis peritoneal en ratones

| Tipo               | Objetivo del experimento   | Ref. |
|--------------------|--|------|
| Largo (12 semanas) | Estudiar el papel de los GDPs en la degradación de la membrana utilizando ratones deficientes de RAGE                            | (28) |
| Agudo (2 horas)    | Estudiar el papel de la Aquaporina-1 en la permeabilidad a agua y ultrafiltración utilizando ratones deficientes de Aquaporina-1 | (29) |
| Agudo (2 horas)    | Caracterización funcional y molecular de la exposición de la cavidad peritoneal de ratones C57BL/6 a líquido de diálisis         | (30) |
| Agudo (2 horas)    | Estudiar el efecto de anestésico intraperitoneal en la permeabilidad y ultrafiltración de ratones C57BL/6                        | (31) |

son de exposición de la membrana peritoneal a los líquidos de diálisis. Pese a estas diferencias con relación a los pacientes, estos modelos han demostrado ser de gran utilidad para estudiar los efectos de la exposición del peritoneo al LD, demostrando que aunque sea en animales no urémicos, ésta puede llevar a fibrosis y angiogénesis responsables del fallo de ultrafiltración.

2. El tiempo de exposición también debe ser visto con cuidado, dado que los pacientes están en tratamiento durante años mientras que los animales de experimentación son tratados durante semanas o, a lo sumo, pocos meses. Los animales de experimentación tienen un metabolismo más rápido que los pacientes, por lo que el daño inducido por los líquidos de diálisis en los animales ocurren más rápidamente que en los pacientes. Lo mismo pasa con los efectos beneficiosos de la terapia, que deben ser más rápidos en los animales que en los pacientes debido a la mayor capacidad regenerativa de los primeros. Otro punto importante con relación a la diferencia de velocidad de metabolismo entre paciente y animal de experimentación es que, un tratamiento que genere un efecto beneficioso para el animal tratado durante un periodo más corto, puede tener efectos secundarios indeseables en los pacientes tratados por un periodo de tiempo más largo. Esto ha pasado con algunas terapias para enfermedades autoinmunes que fueron desarrolladas en modelos animales.

Aunque la diferencia entre la velocidad de metabolismo del animal de experimentación y del paciente pueda ser un problema a la hora de interpretar los resultados, ésta también puede ser nuestra aliada, pues abordajes que en los pacientes llevarían años, en los modelos animales serían mucho más rápidos. Considerando esta diferencia, aún así, el modelo animal es de gran valía para estudiar los mecanismos de deterioro de la membrana peritoneal expuesta al líquido de diálisis, por lo que contribuye enormemente al entendimiento de los mecanismos involucrados en el daño peritoneal, así como a evaluar la biocompatibilidad de los LD y eficacia de terapias.

### LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE DIÁLISIS PERITONEAL

Existen varios modelos de DP en animales (oveja, cabra, ratas, etcétera), pero el más usado es el que utiliza ratas<sup>18</sup>. En este modelo se ha estudiado la biocompatibilidad de los LD y la respuesta inflamatoria desarrollada en el peritoneo frente a la exposición al LD<sup>19-21</sup>, la angiogénesis<sup>22,23</sup> y la importancia de la red vascular en la permeabilidad de la membrana peritoneal<sup>13,24</sup>, la fibrosis<sup>25,26</sup> y el papel de las peritonitis en el daño de la membrana peritoneal<sup>24</sup>.

Los estudios de mecanismos moleculares en modelos expe-

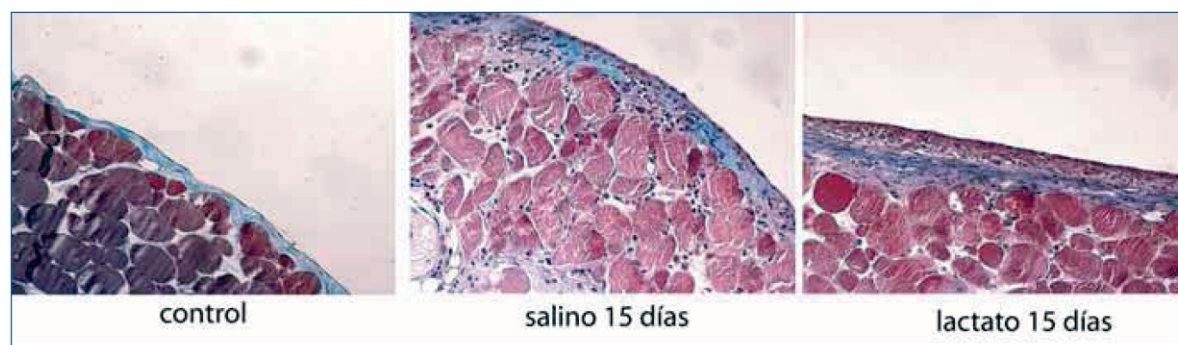
rimentales, independientemente de la especie animal, utilizan anticuerpos, drogas y vectores retrovirales. Aunque estos estudios hayan dado gran impulso en el conocimiento de algunos aspectos del deterioro de la función peritoneal, la metodología utilizada tiene limitaciones. El bloqueo de una determinada proteína, sea por medio de fármacos o por medio de anticuerpos antagonistas carentes de especificidad, tiene una acción apenas transitoria y generalmente están asociados a efectos colaterales. La utilización de vectores adenovirales no es capaz de inhibir todas las células y tiene además una complicación añadida, que es la infección de una célula por un virus. Esta infección puede generar una respuesta inflamatoria capaz de interferir en el resultado del experimento. Recientemente se ha avanzado mucho en el conocimiento de muchas patologías mediante la utilización de ratones modificados genéticamente, bien deficientes en el gen de una proteína o que la sobreexpresan; estos estudios tienen ventajas que podrían contribuir al mayor conocimiento de la patología asociada a la diálisis peritoneal.

Otro factor que limita la contribución de los modelos de ratas de diálisis peritoneal al entendimiento de los procesos involucrados en el daño peritoneal es la ausencia de un protocolo estándar. Esto dificulta la comparación e interpretación de los resultados obtenidos entre los diferentes grupos que trabajan con modelos animales de diálisis peritoneal. Las diferencias entre razas de ratas utilizadas, método de administración, volumen de líquido instilado, y el tiempo de experimentación son comunes entre los diferentes grupos<sup>27</sup>.

Los diferentes métodos de instilación del líquido de diálisis merecen especial atención ya que puede influenciar de forma significativa el resultado de experimento. En los modelos experimentales con ratas el líquido puede ser administrado por inyecciones, o instilado por un catéter abierto o conectado a puerto subcutáneo. La inyección del líquido de diálisis mediante agujas, aunque sean finas, puede causar la lesión del tejido, sangrado, infección y peritonitis. Cuanto más largo sea el experimento, mayor será la contribución de las inyecciones al daño peritoneal, interfiriendo con la interpretación del resultado. Los catéteres abiertos pueden ser una fuente de infección y peritonitis. De esta forma, los catéteres cerrados con un puerto subcutáneo parece ser la mejor opción ya que dificultan la aparición de infección, a pesar de que este tipo de catéter no permite el drenaje del líquido de diálisis diariamente.

El volumen de líquido de diálisis instilado es también otro punto de discordancia entre los modelos utilizados y que también puede alterar los resultados. En ratas, el volumen por instilación varía de 10 a 25 ml. Además, en algunos protoco-





**Figura 2.** La instilación de líquido de diálisis convencional promueve la fibrosis de la membrana peritoneal de ratones. Al final de 15 días de tratamiento diario con solución de diálisis convencional (4,25% de glucosa, Fresenius Medical Care) o salino, biopsias de la membrana parietal fue teñida con tricrómico de Masson para determinar fibrosis. Los resultados demuestran que el tratamiento con lactato induce un mayor engrosamiento de la membrana peritoneal.

los el número de instilaciones diarias puede variar de una a cuatro veces. Esta diferencia de exposición al líquido de diálisis imposibilita la comparación entre los diversos grupos, puesto que cuanto mayor es el volumen de exposición, mayor es el daño. De esta forma, es necesario el desarrollo de un protocolo común de diálisis peritoneal en cada modelo animal con la finalidad de facilitar la comparación e interpretación de los resultados.

#### DIÁLISIS PERITONEAL EN RATONES

Los estudios sobre el efecto de la diálisis peritoneal utilizando el ratón como modelo tienen una dificultad añadida: el tamaño de los animales. Cabe destacar que una rata pesa 300-500 g, mientras que un ratón sólo pesa 28-35 g. Esto exige el desarrollo de dispositivos adecuados a su tamaño, así como adecuar los volúmenes y protocolos de tratamiento. Este podría ser el principal motivo por el cual pocos grupos han dedicado esfuerzos para desarrollar un modelo crónico de diálisis peritoneal en ratones. Además, en los trabajos publicados hasta el momento basados en estudios con ratones se desarrollan experimentos de exposición aguda del peritoneo al LD o un único protocolo de exposición crónica en el que el líquido de diálisis es administrado por inyecciones (tabla II). Sin embargo, el modelo de DP en ratones tiene una ventaja añadida: la posibilidad de utilizar los ratones modificados genéticamente para estudiar las bases moleculares y celulares del daño peritoneal inducido por la exposición continuada a los líquidos de diálisis. Por ejemplo, se pueden utilizar ratones deficientes de las proteínas involucradas en la transición epitelio-mesquimal de las células mesoteliales para determinar el papel de ésta en el proceso patológico; o utilizar ratones deficientes en factores de crecimiento con actividad sobre los fibroblastos.

La ventaja de utilizar los ratones modificados genéticamente nos llevó a intentar desarrollar un modelo de DP en ratones. Inicialmente utilizamos un catéter hecho a mano utilizando un «avocat» y un tubo de silicona. Por medio de una pequeña cirugía, la punta del catéter era introducida en la cavidad peritoneal y la apertura del «avocat» dispuesta en la espalda del ratón a la altura de los omoplatos. Este modelo tenía

diversos inconvenientes: 1) El sistema era abierto, lo que posibilitaba la infección. A pesar de haber tenido apenas un caso de infección en tres experimentos, esto sería siempre un punto de crítica. 2) La presencia del dispositivo en la espalda del ratón era una fuente de estrés que podría afectar el resultado del experimento. 3) Después de la cirugía los ratones tenían que mantenerse separados para evitar que un ratón mordiera el puerto de su compañero. 4) El número de ratones retirados del estudio era muy elevado (del orden del 50%) durante el primer mes de tratamiento. La principal causa era que ellos mismos se extraían el catéter. De este primer modelo, mejoramos sensiblemente la técnica, probando diferentes tipos de catéter y modificando el procedimiento quirúrgico. Actualmente utilizamos un catéter hecho a medida (Pennyport, Access Technologies), con un puerto subcutáneo. Éste ha mejorado mucho el estado de los ratones y redujo la pérdida de animales durante los experimentos a un mes a valores inferiores a 10%. Las mejoras en el modelo permiten ahora la utilización de un reducido número de ratones y poder hacer experimentos más largos. Sin embargo, la utilización del catéter acoplado a un puerto subcutáneo imposibilita el drenaje del líquido, convirtiendo a nuestro modelo en un modelo de exposición crónica de la membrana peritoneal del ratón al líquido de diálisis.

Para ser utilizado como modelo para estudiar el deterioro de la membrana peritoneal en los pacientes sometidos a DP, la exposición de la membrana peritoneal de los ratones debe mimetizar los efectos observados en los pacientes. La membrana peritoneal de los ratones expuestos a los líquidos de diálisis sufren engrosamiento de forma similar a la observada en humanos. La causa del engrosamiento es principalmente la fibrosis por deposición de colágeno (fig. 2). Además, se puede observar un incremento en el número de vasos que puede ser responsable del fallo de la ultrafiltración. En estas condiciones, el modelo de DP en ratones contribuirá al entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares de las alteraciones peritoneales inducidas por el líquido de diálisis y como consecuencia a la identificación de dianas para terapias capaces de prevenir o reducir el daño peritoneal.

Esperamos que este modelo experimental contribuya de forma sensible al esclarecimiento de los mecanismos celulares

y moleculares involucrados en el proceso de deterioro de la membrana peritoneal expuesta al líquido de diálisis, por medio de la utilización de los ratones manipulados genéticamente.

### CONCLUSIÓN

Los mecanismos involucrados en el deterioro de la membrana peritoneal en respuesta al líquido de diálisis aún son poco conocidos. Esto es debido en gran parte a las limitaciones de trabajar con muestras de pacientes, y por las deficiencias en los modelos animales disponibles hasta el momento, para abordar los mecanismos involucrados en el proceso de deterioro de la membrana peritoneal. El desarrollo de un modelo de diálisis peritoneal en ratones subsanará las limitaciones encontradas en los modelos anteriores, a través de la utilización de animales manipulados genéticamente. Este modelo contribuirá a la comprensión de los mecanismos celulares y moleculares del proceso de deterioro de la función peritoneal. Como consecuencia de este progreso, esperamos que, en un futuro no muy lejano, seamos capaces de desarrollar líquidos de diálisis más biocompatibles y terapias para prevenir, retardar o tratar el daño peritoneal inducido por la diálisis peritoneal.

### Conflicto de intereses

Este trabajo ha recibido las siguientes ayudas: SAF2007-61201 de M. L. Cabrera, FIS P106/0098 y RETICS 06/0016 (REDinREN) de R. Selgas y M Ruiz-Ortega. G. T. González-Mateo recibe soporte financiero de Gambro Europa.

### BIBLIOGRAFÍA

- Di Paolo N, Sacchi G. Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int* 2000; 20 (Supl. 3): S5-96.
- Mateijsen MA, Van der Wal AC, Hendriks PM, Zweers MM, Mulder J, Struijk DG y cols. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of capd patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int* 1999; 19: 517-25.
- Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR y cols. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13: 470-9.
- Inagi R, Miyata T, Yamamoto T, Suzuki D, Urakami K, Saito A y cols. Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett* 1999; 463: 260-4.
- Margetts PJ, Bonniaud P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* 2003; 23: 530-41.
- Zareie M, Hekking LH, Welten AG, Driesprong BA, Schadee-Eestermans IL, Faict D y cols. Contribution of lactate buffer, glucose and glucose degradation products to peritoneal injury in vivo. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18: 2629-37.
- Williams JD, Topley N, Craig KJ, Mackenzie RK, Pischetsrieder M, Lage C y cols. The euro-balance trial: The effect of a new biocompatible peritoneal dialysis fluid (balance) on the peritoneal membrane. *Kidney Int* 2004; 66: 408-18.
- Selgas R, Paiva A, Bajo MA, Cirugeda A, Aguilera A, Díaz C y cols. Consequences of peritonitis episodes appearing late during peritoneal dialysis (pd) in patients able to continue pd. *Adv Perit Dial* 1998; 14: 168-72.
- Betjes MG, Visser CE, Zemel D, Tuk CW, Struijk DG, Krediet RT y cols. Intraperitoneal interleukin-8 and neutrophil influx in the initial phase of a capd peritonitis. *Perit Dial Int* 1996; 16: 385-92.
- McLoughlin R. Resolving peritoneal inflammation: flicking the right «Switches». *Perit Dial Int* 2005; 25: 223-9.
- Honda K, Nitta K, Horita S, Tsukada M, Itabashi M, Nihei H y cols. Histologic criteria for diagnosing encapsulating peritoneal sclerosis in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2003; 19: 169-75.
- Jiménez-Heffernan JA, Cirugeda A, Bajo MA, Del Peso G, Pérez-Lozano ML, Perna C y cols. Tissue models of peritoneal fibrosis. *Int J Artif Organs* 2005; 28: 105-11.
- Krediet RT, Zweers MM, Van der Wal AC, Struijk DG. Neovascularization in the peritoneal membrane. *Perit Dial Int* 2000; 20 (Supl. 2): S19-25.
- Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano ML, Cirugeda A y cols. Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 938-48.
- Pecoits-Filho R, Araujo MR, Lindholm B, Stenvinkel P, Abensur H, Romão JE Jr y cols. Plasma and dialysate il-6 and vegf concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17: 1480-6.
- Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramírez-Huesca M, Domínguez-Jiménez C, Jiménez-Heffernan JA y cols. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348: 403-13.
- Jiménez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, Del Peso G y cols. Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; 444: 247-56.
- Wieczorowska K, Khanna R, Moore HL, Nolph KD, Twardowski ZJ. Rat model of peritoneal fibrosis: preliminary observations. *Adv Perit Dial* 1995; 11: 48-51.
- Bazargani F. Acute inflammation in peritoneal dialysis: experimental studies in rats. Characterization of regulatory mechanisms. *Swed Dent J Suppl* 2005; 1-57, i.
- Hurst SM, McLoughlin RM, Monslow J, Owens S, Morgan L, Fuller GM y cols. Secretion of oncostatin m by infiltrating neutrophils: regulation of il-6 and chemokine expression in human mesothelial cells. *J Immunol* 2002; 169: 5244-51.
- Kim YL, Do J, Park SH, Cho K, Park J, Yoon K y cols. Low glucose degradation products dialysis solution modulates the levels of surrogate markers of peritoneal inflammation, integrity, and angiogenesis: preliminary report. *Nephrology (Carlton)* 2003; 8 Supl.: S28-32.
- Gillerot G, Devuyst O. Molecular mechanisms modifying the peritoneal membrane exposed to peritoneal dialysis. *Clin Nephrol* 2003; 60: 1-6.
- Lameire N, Van Biesen W, Mortier S, De Vriese A. What did we learn from animal models in peritoneal dialysis? *Contrib Nephrol* 2006; 150: 70-6.
- Margetts PJ, Kolb M, Yu L, Hoff CM, Holmes CJ, Anthony DC y cols. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. *Am J Pathol* 2002; 160: 2285-94.
- Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA y cols. Transient overexpression of tgf- $\beta$ 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 425-36.
- Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gauldie J. Gene transfer of transforming growth factor- $\beta$ 1 to the rat peritoneum: Effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2029-39.
- Mortier S, Lameire NH, De Vriese AS. Animal models in peritoneal dialysis research: a need for consensus. *Perit Dial Int* 2005; 25: 16-24.
- Schwenger V, Morath C, Salava A, Amann K, Sereginy Y, Deppisch R y cols. Damage to the peritoneal membrane by glucose degradation products is mediated by the receptor for advanced glycation end-products. *J Am Soc Nephrol* 2006; 17: 199-207.
- Ni J, Verbavatz JM, Rippe A, Boisdé I, Moulin P, Rippe B y cols. Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2006; 69: 1518-25.
- Ni J, Cnops Y, Debaix H, Boisdé I, Verbavatz JM, Devuyst O. Functional and molecular characterization of a peritoneal dialysis model in the c57bl/6j mouse. *Kidney Int* 2005; 67: 2021-31.
- Shin SK, Kamerath CD, Gilson JF, Leyboldt JK. Effects of anaesthesia on fluid and solute transport in a c57bl6 mouse model of peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21: 2874-80.



## ➤ IV.1.1.2.- Diálisis Peritoneal experimental

## 34

## Diálisis peritoneal experimental

Jesús Loureiro Álvarez, Guadalupe Tirma González-Mateo y Luiz Stark Aroeira

**INTRODUCCIÓN**

La diálisis peritoneal es un proceso bioincompatible. La continua exposición de la membrana peritoneal a los líquidos de diálisis de manera crónica lleva al deterioro de la membrana peritoneal. Estudios realizados en biopsias peritoneales de pacientes en diálisis peritoneal muestran los daños que esta terapia ocasiona en el peritoneo, caracterizados por la fibrosis y la angiogénesis<sup>1-3</sup>. Estos cambios conllevan, en última instancia, a la pérdida de la capacidad de ultrafiltración de la membrana peritoneal. Investigar con material humano acarrea una serie de problemas técnicos y éticos. Debido a ello los procesos y cambios ocasionados durante la diálisis peritoneal sólo pueden ser estudiados en los diversos modelos animales.

**MODELOS ANIMALES PARA LA DIÁLISIS PERITONEAL**

El animal de laboratorio ha contribuido de forma fundamental en el desarrollo de ciencias biomédicas. Son utilizados en modelos que visan investigar y comprender las causas, desarrollar diagnósticos y tratamiento de enfermedades que afectan tanto a los humanos como a los animales. Utilizando los modelos animales se han estudiado terapias contra patologías autoinmunes<sup>4,5</sup>, cáncer<sup>6,7</sup> trasplante de órganos<sup>8,9</sup> y sida<sup>10</sup>; evidencias que demuestran la importancia de los animales en la ciencia biomédica. La utilización de los animales en diálisis peritoneal podrá contribuir de la misma forma.

Los modelos animales de diálisis peritoneal buscan reproducir en la membrana peritoneal las alteraciones presentes en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal. El modelo ideal, definido por su semejanza con la enfermedad a estudio, consiste en la utilización de animales urémicos en los que el líquido de diálisis se insti-

la mediante un catéter fijo y es drenado a través del mismo. Existen una serie de modelos que utilizan el conejo, que presentan estas características, siendo los resultados obtenidos comparables a lo que ocurre en los pacientes en diálisis peritoneal. El problema fundamental de este modelo es que sólo puede ser empleado en animales de mediano y gran porte, lo cual acarrea un aumento del coste económico y una mayor duración del experimento, así como la necesidad de mayor espacio para el desarrollo del mismo. En animales de pequeño porte el drenado del líquido instilado no es posible. La solución de diálisis instilada en los animales no urémicos es eliminada por la orina. En estos casos, aunque se sigan tratando como modelos de diálisis peritoneal, en realidad son modelos de exposición crónica peritoneal a los líquidos de diálisis. En estos, los daños ocasionados por el tratamiento son equiparables a los observados en los pacientes sometidos a diálisis peritoneal. Estas observaciones validan el modelo como una herramienta de estudio de los procesos deletéreos que sufren los pacientes durante la diálisis peritoneal.

En la actualidad, la gran mayoría de los modelos animales hacen uso de animales no urémicos, ya que existe cierta controversia acerca del papel que tiene la uremia en el deterioro peritoneal<sup>11,12</sup>. Además existe una evidencia experimental de que los resultados obtenidos haciendo uso de animales urémicos y no urémicos son equiparables<sup>13</sup>. Estos resultados validan el uso de animales no urémicos, lo que facilita el desarrollo experimental, tanto por motivos técnicos como de índice de mortalidad de los animales empleados.

La existencia de diversos modelos animales permite seleccionar el más adecuado a las condiciones del experimento a realizar. El uso de uno u otro animal también puede ser seleccionado dependiendo del proceso que se desee estudiar. En la tabla 34-1 se muestran las ventajas e inconvenientes que presenta la utilización de los dis-

**Tabla 34-1** Ventajas y desventajas de los modelos animales de diálisis peritoneal

| Animal | Ventaja  | Desventaja  |
|--------|--|---|
| Conejo | Possibilidad de crear un modelo ideal<br>Relación de volumen/área peritoneal semejante a la del hombre   | Precio<br>Espacio para estabulación<br>Fragilidad de animal                                 |
| Rata   | Precio<br>Resistencia del animal<br>Diferentes cepas con fondos genéticos bien estudiados<br>Espacio para estabulación                         | Imposibilidad de drenar líquido de diálisis<br>Dificultad para establecer animales urémicos |
| Ratón  | Precio<br>Resistencia del animal<br>Diferentes cepas con fondos genéticos bien estudiados<br>Espacio para estabulación<br>Ratones transgénicos | Imposibilidad de drenar líquido de diálisis<br>Dificultad para establecer animales urémicos |

tintos animales que se emplean habitualmente para el estudio de la diálisis peritoneal.

## ESTANDARIZACIÓN DE LOS MODELOS ANIMALES DE DIÁLISIS PERITONEAL

Un factor que limita la contribución de los modelos animales al entendimiento de los procesos involucrados en el daño peritoneal es la ausencia de un protocolo estándar. Existen una gran cantidad de grupos de investigación que han desarrollado, de modo independiente, su modelo animal de diálisis peritoneal, lo que conlleva diferencias en los protocolos empleados por unos y otros. Esto dificulta la comparación e interpretación de los resultados obtenidos entre los diferentes grupos. Existen diferencias entre una gran variedad de factores importantes en el desarrollo del daño peritoneal, como son las vías de administración, el volumen de líquido instilado y los tejidos analizados<sup>14</sup>. También existe disparidad con respecto a la utilización de diferentes cepas, así como los tiempos de experimentación. Todo ello acarrea problemas de extrapolación de los resultados de un modelo a otro y disparidades de resultados. Por otra parte, esta riqueza de modelos de diálisis peritoneal aporta una gran información acerca de la importancia que tienen estos factores en el desarrollo del deterioro peritoneal durante el proceso de diálisis, y podría, tras un exhaustivo análisis, arrojar más luces que sombras a la comprensión de los procesos deletéreos que ocasionan el daño peritoneal.

## VÍAS DE INSTILACIÓN DEL LÍQUIDO DE DIÁLISIS

Hasta el momento existen tres técnicas básicas para la instilación del líquido de diálisis en el interior de la cavidad peritoneal del animal. Algunos modelos de rata introducen la solución dentro de la cavidad peritoneal mediante punción en la pared frontal abdominal haciendo uso de una aguja de 22G<sup>15</sup>. Repetidas punciones pueden causar hemorragias intraperitoneales, infección o trauma al tejido peritoneal, todo lo cual puede repercutir sobre los resultados experimentales obtenidos. Aunque no ocurra una infección bacteriana, el daño causado por los sucesivos pinchazos activan el *omentum*<sup>16</sup>. En consecuencia, éste secretará una gran cantidad de factores de crecimiento, factores angiogénicos y profibróticos que alterarán el resultado final. Cuanto más largo sea el experimento, mayor será la contribución de las inyecciones al daño peritoneal y a la activación de la angiogénesis y la fibrosis, interfiriendo con la interpretación de los resultados.

Otro método es el de instalar un catéter de modo permanente en el animal de manera que la apertura de éste se encuentre en el exterior de su cuerpo. Es el único método que permite la instilación y posterior recogida del líquido de diálisis, como sucede en los pacientes en diálisis peritoneal<sup>17,18</sup>. El riesgo de infección es alto debido a la apertura del catéter. También es alto el riesgo de la obstrucción del catéter debido al *omentum*, las adhesiones y la fibrosis<sup>19</sup>.

El tercer método es el último en ser desarrollado. También se trata de un catéter fijo que va desde la cavidad peritoneal hasta el lomo del animal, cercano al cuello en donde



está conectado a un puerto subcutáneo. El drenaje del líquido de diálisis a través del catéter no es posible, por lo que debe ser asimilado en su totalidad por el animal. Este método reduce el riesgo de infección, aunque el malfuncionamiento del catéter debido a obstrucción sigue presentando un problema al igual que en el método anterior.

Un aspecto a considerar es el hecho de que la presencia de un catéter en la cavidad peritoneal causa una reacción de cuerpo extraño que podría alterar el resultado final del experimento<sup>20</sup>. Utilizando el modelo en ratones, hemos observado que la presencia del catéter induce inflamación y fibrosis en las áreas de contacto con el mesotelio. Pero no hemos observado una alteración importante en otras áreas después de 30 días de tratamiento (Aroeira, observación personal). Por otra parte, hay que tener en cuenta que el catéter también está presente en el peritoneo del paciente, siendo así la mejor forma de imitar la diálisis peritoneal en animales.

### VOLUMEN INSTILADO, FRECUENCIA DE INSTILACIÓN Y TIEMPO DE EXPOSICIÓN

Los humanos tienen un área de superficie peritoneal de aproximadamente 1700 cm<sup>2</sup>, las ratas Wistar con un peso de 350 g poseen un área de su superficie peritoneal de alrededor de 60 cm<sup>2</sup>. Por tanto un volumen de 70 mL en la rata debería ser proporcional a la usada clínicamente en humanos<sup>21,22</sup>. Sin embargo, debido a las complicaciones respiratorias que este volumen ocasionaría, tan sólo un volumen máximo de 30-40 mL puede ser instilado. En modelos de rata de diálisis peritoneal el volumen mayoritariamente utilizado es de 10 mL<sup>13</sup>. El mismo problema sucede en los ratones, siendo 1,5 mL el volumen instilado (González-Mateo y cols.). Sin embargo, los conejos son normalmente instilados con 40 mL/kg de solución de diálisis, que es más proporcional al volumen empleado en humanos<sup>23</sup>. Sin embargo, es recomendable que este volumen sea instilado gradualmente con el fin de evitar problemas respiratorios causados por la introducción de una gran cantidad de fluido<sup>24</sup>.

La frecuencia de las instilaciones varía dependiendo de los diferentes grupos de investigación, oscilando de una a tres veces diarias<sup>15,25,26</sup>. El exponer repetidamente durante el mismo día el peritoneo al líquido de diálisis mimetiza los programas de intercambio a los que son sometidos los pacientes de DP.

Hasta el momento no existe un consenso sobre el período de exposición óptimo necesario para el desarrollo de alteraciones específicas en la membrana peritoneal, lo cual es debido en gran parte a la disparidad de protocolos

empleados por los distintos grupos de investigación. Por otro lado, un análisis a diferentes tiempos puede dar idea de la secuencia de los eventos claves del deterioro de la membrana peritoneal.

### TEJIDOS ANALIZADOS

A expensas del tipo de modelo animal con el que estemos trabajando, el principal problema en el estudio de la estructura de la membrana peritoneal es la obtención de unas muestras válidas y representativas del tejido a estudiar. Una gran cantidad de grupos utilizan el peritoneo visceral de los animales analizados. En el caso de los humanos, sin embargo, la mayoría de estudios se realizan analizando el peritoneo parietal. Los análisis de biopsias de peritoneo parietal y visceral de los mismos pacientes sugieren que las alteraciones sufridas en la membrana visceral son menos pronunciadas que las de la membrana parietal. Lo inverso ha sido observado en algunos estudios usando modelos animales, lo que justifica que el tejido mayormente empleado sea el peritoneo visceral<sup>27,28</sup>. No existe consenso sobre las zonas de las que los diversos tejidos deben ser extraídos, pudiendo contribuir este hecho a los resultados finales y a la comparación entre los obtenidos por diferentes modelos animales<sup>14</sup>. Cabe resaltar que cuando se hace uso de un catéter fijo en el animal, la zona del peritoneo donde este se encuentra se ve afectada, produciéndose una reacción al cuerpo extraño que causa un aumento de la fibrosis e inflamación. Si se toma esta parte del tejido como representativa se está cometiendo un error, dado que no se corresponde con el daño producido por el líquido de diálisis, si no con el causado por el catéter.

Otro factor a tener en cuenta es la extrema fragilidad del tejido peritoneal, el cual se seca rápidamente al ser expuesto al aire, y reacciona con cambios ultraestructurales ante la luz o el contacto con guantes quirúrgicos. Por tanto, la muestra debe ser obtenida y fijada inmediatamente después de la apertura de la cavidad peritoneal<sup>21</sup>.

Tanto las dificultades técnicas como la disparidad de criterios a la hora de seleccionar uno u otro tejido hacen recomendable que el número de muestras recogidas sea el mayor posible, con vista a poder esclarecer el daño real ocasionado por el tratamiento en el animal.

### DIFERENCIA ENTRE CEPAS

Es frecuente que los diferentes grupos de investigación usen distintas cepas de ratas y/o ratones para llevar a cabo sus experimentos. En muchos casos se conoce gran

cantidad de datos de dichas cepas, dentro de los cuales se incluye su respuesta ante el daño tisular crónico, así como a los procesos inflamatorios. Gracias a estos datos previos puede llegar a discernirse la influencia del fondo genético de los animales empleados en los resultados finales obtenidos. El conocimiento de las características de las distintas cepas hace que se pueda seleccionar la que se considere más adecuada para el estudio que se desea realizar. La elección de una determinada cepa se hace imprescindible cuando se manipulan ratones modificados genéticamente. En estos estudios deben tomarse como grupo de control de animales que sean de la misma cepa que los modificados genéticamente, para asegurarse de que los resultados obtenidos son debidos a la modificación realizada en su genoma y no a diferencias en su fondo genético.

#### DIÁLISIS PERITONEAL EN RATONES

El desarrollo de ratones modificados genéticamente es un arma muy potente de la que la investigación en diálisis peritoneal casi no se ha podido nutrir, debido a las dificultades técnicas que conlleva el pequeño porte de estos animales, sobre todo a la hora de implantar un catéter. Debido a la posibilidad de testar la amplia gama de ratones modificados genéticamente que ya existen en la actualidad, el empleo de modelos utilizando este animal representa el futuro de la investigación *in vivo* dentro del campo de la diálisis peritoneal.

Cabe destacar que una rata adulta pesa 300-500 g, mientras que el peso de un ratón adulto ronda los 20-35 g. Esto exige el desarrollo de catéteres adecuados a su tamaño, así como de unos volúmenes de instilación mucho menores. El pequeño tamaño del catéter representa una dificultad técnica durante la cirugía, más fácilmente abordada cuanto mayor es el tamaño del animal. Estos podrían ser los principales motivos por los que pocos grupos han dedicado esfuerzos para desarrollar un modelo crónico de diálisis peritoneal en ratones.

A consecuencia de estas dificultades, la mayoría de los trabajos publicados hasta el momento, haciendo uso de ratones, desarrollan experimentos de exposición aguda del peritoneo al líquido de diálisis mediante punción de la pared frontal abdominal. En estos trabajos se estudió la función peritoneal de ratones C57BL/6<sup>29</sup>, así como el efecto de los anestésicos sobre la ultrafiltración<sup>30</sup>, y el papel de la aquaporina I sobre el transporte de agua<sup>31</sup>. Estos estudios permiten contestar preguntas simples sobre la función peritoneal en una situación determinada, pero no contribuyen a un mayor entendimiento de los mecanismos involucrados en el desarrollo del fallo de membrana.

Un único estudio crónico fue realizado en ratones, donde la solución de diálisis fue administrada a través de inyecciones. En este trabajo se utilizaron ratones modificados genéticamente, en concreto se trata de ratones con los genes de RAGEs silenciados (*knockout*). Los resultados sirvieron para demostrar el papel de los productos de degradación de la glucosa sobre el deterioro de la membrana peritoneal inducido por la exposición de la misma a líquidos de diálisis conteniendo GDP<sup>32</sup>.

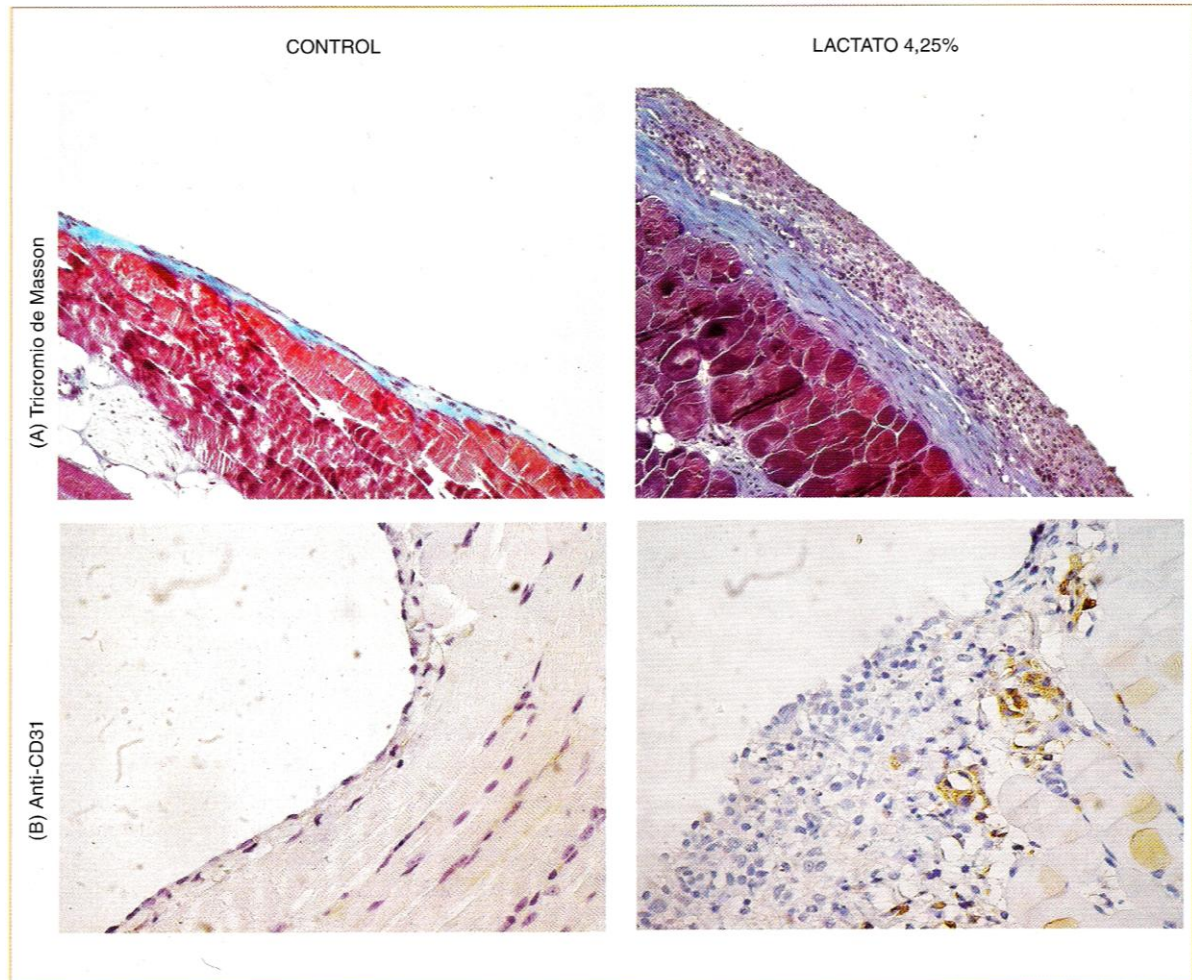
El desarrollo de un modelo de diálisis peritoneal en ratón, empleando un catéter permanente en la cavidad peritoneal unido a un puerto subcutáneo es de desarrollo reciente (González-Mateo y cols. PDI aceptado para publicación). Éste permitirá realizar una gran cantidad de estudios que podrán darnos información acerca del papel de determinados genes en el desarrollo del daño peritoneal. En el proceso de validación de la metodología se instilaron ratones diariamente (1,5 mL), por un período superior a 35 días, con soluciones estándar de líquido de diálisis.

Los daños peritoneales eran ya evidentes tras los primeros 15 días de tratamiento. Después de un mes de instilaciones diarias se observó un incremento del número de vasos y del grosor peritoneal (v. figura 34-1), así como la presencia de células citoqueratina positivas en el espacio submesotelial (Aroeira y cols., PDI en imprenta). Todos estos datos corroboran la validez del modelo por su proximidad con el daño que presentan los pacientes de diálisis peritoneal tras años de tratamiento (González-Mateo y cols. PDI aceptado para publicación, Aroeira y cols., PDI en imprenta). La creación de este modelo puede ser tomado como patrón por otros grupos de investigadores, pudiendo producir el conocimiento de la técnica un salto cualitativo en las investigaciones sobre los mecanismos moleculares implicados en el deterioro peritoneal.

#### COMPARACIÓN ENTRE EL PERITONEO DE LOS ANIMALES Y EL DE LOS HUMANOS

Las células mesoteliales son células del tipo epitelial especializadas que recubren los órganos internos y las cavidades del cuerpo. Las células mesoteliales son iguales independientemente de los órganos que recubren o la cavidad a que pertenecen. Las características morfológicas también están conservadas en diferentes especies (humanos, conejos, ratas, ratones), presentando una forma alargada y escamo-





**Figura 34-1** Membranas peritoneales parietales de ratones sin tratamiento (controles) y tratados durante 30 días con líquido de diálisis convencional (lactato con glucosa 4,25%). **A.** Tinción con tricromio de Masson (20X); **B.** Tinción inmunohistoquímica con anti-CD31 (40X).

sa<sup>33,34</sup>. Una célula mesotelial con forma cuboide fue descrita cerca de áreas de lesión o revistiendo órganos parenquimatosos, diafragma o placa de Peyer. Estas parecen presentar un estado de activación distinto a las primeras<sup>35</sup>.

La estructura peritoneal de los animales utilizados como modelo de diálisis peritoneal es similar a la de los pacientes. No obstante, algunos otros factores deben ser considerados a la hora de desarrollar un modelo de diálisis peritoneal. Ratas y ratones tienen una relación entre el área de la superficie del peritoneo y el volumen de intercambio superior a la de los pacientes. En los conejos esta relación es similar a la de los pacientes<sup>21</sup>.

Otro punto importante a ser considerado en el desarrollo de los modelos animales son posibles diferencias con

relación al transporte a través de la membrana peritoneal. El transporte por la membrana peritoneal de ratas es similar al de los humanos, si se consideran las escalas desarrolladas para estudiar la farmacocinética entre animales de diferentes masas corporales. Los ratones también presentan valores de transporte similares a los primeros a la excepción de la eliminación de macromoléculas del peritoneo al plasma<sup>36</sup>.

Existen diferencias metabólicas entre las especies que pueden limitar la utilización de los modelos animales. Los roedores poseen una gran cantidad de amilasa, tanto en el suero como en el peritoneo. Esta enzima es capaz de romper azúcares de cadenas largas, como es el caso de la icodextrina. El procesamiento de estas molé-



culas causa un incremento de la osmolaridad en la cavidad peritoneal de estos animales por lo que imposibilita la utilización de estos modelos animales en el papel de la icodextrina en la preservación de la membrana y el transporte peritoneal<sup>37,38</sup>.

El metabolismo de los animales de experimentación es más rápido que el de los humanos. Por ello una exposición a los líquidos de diálisis de semanas o unos pocos meses, en los modelos animales, es capaz de causar los cambios peritoneales semejantes a los causados por años de tratamiento en pacientes. Asimismo, la regeneración de los tejidos de los animales empleados en estos estudios (conejos, ratas y ratones) ocurre con mayor rapidez de lo que sucede en humanos. Estos factores deben ser tomados en cuenta a la hora de extrapolar los resultados obtenidos en modelos animales para su aplicación clínica en los pacientes.

#### APORTACIÓN DEL MODELO ANIMAL AL CONOCIMIENTO DE LOS PROCESOS QUE TIENEN LUGAR DURANTE LA DIÁLISIS PERITONEAL

La mayor aportación de los modelos animales es el mejor conocimiento de los mecanismos involucrados en las alteraciones morfológicas y funcionales causadas por la exposición a las soluciones de diálisis; un buen ejemplo son los estudios realizados tanto en ratas como en conejos, que han demostrado la importancia de los vasos sanguíneos en la permeabilidad de la membrana. La permeabilidad de los vasos sanguíneos a los solutos y al agua es intrínseca a los mismos, por lo que es el número de capilares por área de peritoneo, el que determinará la permeabilidad del mismo<sup>39,40</sup>. Este descubrimiento sirvió para comprender la importancia de la angiogénesis en el fallo de la membrana peritoneal. Con respecto a la importancia de los cambios que ocurren en el sistema vascular peritoneal, se demostró que durante procesos infecciosos la permeabilidad vascular está alterada, aumentándose y contribuyendo de este modo al fallo de ultrafiltración<sup>41-43</sup>. Además de estos cambios en los vasos sanguíneos del peritoneo, los modelos animales han demostrado el desarrollo de la fibrosis peritoneal<sup>41,44-46</sup>, la biocompatibilidad<sup>47</sup> y la existencia de una respuesta inflamatoria, en ausencia de infección, frente a la exposición a los líquidos de diálisis<sup>45,48</sup>.

El estudio del papel de diversas moléculas dentro de la diálisis peritoneal ha sido llevado a cabo haciendo uso de diversos modelos animales. Diferentes estrategias fueron utilizadas para abordar estos estudios, como son el uso de

anticuerpos neutralizantes, drogas o expresión transitoria de genes por medio de adenovirus. Estos estudios demostraron el papel de los canales de agua (aquaporinas) en el transporte peritoneal de solutos<sup>49</sup>, del NO inducido durante la peritonitis sobre la permeabilidad vascular<sup>50</sup> del VEGF en el daño peritoneal<sup>51</sup>, del TGF- $\beta$  en la fibrosis<sup>52</sup> y de papel de la interacción RAGE-AGE sobre el daño peritoneal<sup>44</sup>. La utilización de ratones manipulados genéticamente ha confirmado algunos de estos hallazgos. En concreto, existen estudios en los que se hizo uso de ratones deficientes en RAGE<sup>32</sup>, aquaporina<sup>31</sup> y óxido nítrico endotelial<sup>43</sup>.

#### TRATAMIENTOS CONTRA LOS EFECTOS DELETÉREOS DE LA DIÁLISIS PERITONEAL TESTADOS EN MODELOS ANIMALES

Una vez que los modelos de diálisis peritoneal presentan alteraciones morfo-funcionales de la membrana peritoneal similares a las observadas en los pacientes, estos modelos pasan a ser una herramienta importante para probar mejorías en los líquidos de diálisis y terapias para prevenir o remediar el daño peritoneal. Varios estudios fueron hechos en el sentido de testar la biocompatibilidad de los líquidos de diálisis en modelos animales (v. tabla 34-2). Estos estudios demostraron que los líquidos bajos en GDP son más biocompatibles que los convencionales. Con respecto a los líquidos de diálisis que utilizan aminoácidos como agentes osmóticos, los resultados muestran que presentan un alto grado de biocompatibilidad, superior a cualquier otra solución dialítica, pero con el inconveniente de presentar menor poder osmótico<sup>45</sup>. Estos estudios demuestran que diversos factores, como la glucosa, los GDP, y los tampones empleados afectan, de forma diferente, a la membrana peritoneal, aumentando o disminuyendo la velocidad del daño peritoneal.

Grandes esfuerzos están siendo realizados con el fin de desarrollar terapias capaces de retardar, prevenir y/o tratar el deterioro del peritoneo inducido por la diálisis peritoneal. Se ha demostrado que la inflamación y los GDP de los líquidos de diálisis juegan un papel importante en la pérdida de función peritoneal y la fibrosis por lo que los agentes antiinflamatorios o con acción sobre la vía de los GDP pasaron a tener potencial terapéutico. En este sentido, estudios realizados en animales han demostrado el potencial terapéutico de la heparina, revelando que su acción antiinflamatoria puede ejercer una mejora en la capacidad de ultrafiltración<sup>17,27,42</sup>. Diversos ensayos clínicos en pacientes han confirmado el efecto antiinflamato-



**Tabla 34-2** Estudio de biocompatibilidad de soluciones de diálisis en modelos animales

| Especie       | Estudio                                    | Parámetros/tipo de experimento                         | Resultados   | Ref. |
|---------------|--|--|--|------|
| <b>Conejo</b> | Lactato vs. Bic-Gly                        | Función peritoneal; agudo                              | Bic-Gly aumenta ultrafiltración, disminuye absorción de glucosa  | [66] |
|               | Aminoácidos vs. glucosa                    | Alteraciones patológicas; crónico.                     | Soluciones con aminoácidos son más biocompatibles que las que contienen glucosa                                | [67] |
|               | Bicarb. vs. lactato                        | Función peritoneal e inflamación; crónico.             | No observa diferencias de biocompatibilidad entre líquidos con lactato o con bicarbonato                       | [68] |
|               | Bicarb. vs. lactato                        | Alteraciones histológicas; crónico.                    | La glucosa induce senescencia de las células mesoteliales y reduce la proliferación                            | [69] |
| <b>Rata</b>   | Distintas soluciones filtradas vs. lactato | Función peritoneal; agudo.                             | Bajo pH y GDPs causan aumento en el transporte de pequeños solutos   | [70] |
|               | Distintas soluciones vs. lactato           | Efecto de los GDPs sobre los vasos mesentéricos; agudo | Los GDPs inducen vasodilatación de las arterias mesentéricas   | [71] |
|               | Glucosa vs. aminoácidos                    | Alteraciones patológicas e inflamación; crónico.       | Solución con AA es más biocompatible que las de glucosa  | [45] |
|               | Bicarb./lactato vs. solución estándar      | Inflamación y angiogénesis; crónico.                   | Solución estándar induce más inflamación y angiogénesis  | [72] |
|               | Bicarbonato vs. lactato                    | Inflamación; agudo                                     | Bicarbonato incrementa el reclutamiento de leucocitos  | [73] |
|               | Bicarbonato vs. lactato                    | Transporte peritoneal e histología; crónico            | Bicarbonato incrementa la permeabilidad y reduce fibrosis  | [74] |
|               | Bicarbonato + glicilglicina vs. lactato    | Transporte peritoneal e histología; crónico            | Bicarbonato + glicilglicina reduce reabsorción de glucosa a día 1 y pérdida de proteína a 4 semanas.           | [75] |
|               | Bicarbonato vs. lactato                    | Transporte peritoneal e inflamación con LPS; crónico   | Disminuye la respuesta inflamatoria inespecífica. Mayor producción de citoquinas inflamatorias después del LPS | [76] |
|               | Bicarbonato + lactato vs. lactato          | Transporte peritoneal, histología y AGEs; crónico      | Bicarb. + lactato aumenta la ultrafiltración, disminuye la acumulación de AGEs y daño mesotelial               | [77] |
|               | Lactato vs. piruvato                       | Función peritoneal; crónico                            | Piruvato es más biocompatible que lactato  | [46] |
| <b>Ratón</b>  | Bicarb. vs. lactato                        | Alteraciones histológicas; agudo y crónico             | Bicarbonato más biocompatible que lactato, con mayor supervivencia del mesotelio                               | [60] |

rio, sobre el peritoneo, de la heparina, suministrada en dilución en el líquido de diálisis<sup>53</sup>.

La indometacina es otro agente antiinflamatorio, cuya función es la de inhibir la enzima ciclooxigenasa. Su uso en un modelo animal de diálisis peritoneal ha demostrado un efecto beneficioso sobre la permeabilidad peritoneal aumentando la ultrafiltración<sup>54</sup>. En pacientes, dicho fármaco también ha sido testado, resul-

tando su uso en un aumento en la capacidad de ultrafiltración de pacientes con peritonitis<sup>55</sup>, siendo inocuo para aquellos que no la presentan<sup>56</sup>. El tratamiento con un inhibidor selectivo de COX-2 fue capaz de lograr la reducción de la fibrosis y el aumento de la ultrafiltración en un modelo de ratón de exposición peritoneal crónica a los líquidos de diálisis (Aroeira, observación personal). El tratamiento con inhibidor selectivo de COX-2 puede

tener efectos beneficiosos para los pacientes en determinadas situaciones.

Buscando la neutralización de los GDP y de sus efectos tóxicos, la aminoguanidina fue utilizada en un modelo animal de diálisis peritoneal. Se trata de un quelante de los GDP que impide la formación de los AGE<sup>57</sup>. La adición de la aminoguanidina en el líquido de diálisis consiguió inhibir la formación de AGE, así como la denudación de la membrana mesotelial y la pérdida de la ultrafiltración<sup>57,58</sup>. Sin embargo, la administración oral de aminoguanidina ha causado adustos de piridoxal, causando complicaciones neurotóxicas<sup>59</sup>. Este efecto adverso puede imposibilitar su utilización en pacientes, pero existe la posibilidad de utilizar esta vía como diana terapéutica.

Muchas otras sustancias han sido testadas con el objetivo de prevenir o paliar el daño causado por la exposición a los líquidos de diálisis. Algunas de ellas han demostrado efectos contradictorios, posiblemente causados por diferentes metodologías utilizadas. Sin embargo, la unificación de protocolos y mejora de la especificidad de las drogas puede mejorar el tratamiento y la prevención del daño peritoneal causado por la exposición a las soluciones de diálisis.

## REGENERACIÓN DE LA MEMBRANA PERITONEAL

Una de las consecuencias deletéreas de la DP es la denudación de la membrana peritoneal que origina un proceso de cicatrización, el cual es causa de fibrosis y la consiguiente pérdida de la función dializadora de la membrana. Todavía se desconoce el proceso de regeneración tisular que ocurre en el peritoneo de los pacientes en DP. Sin embargo, existen una serie de estudios, realizados en diversos modelos animales, que dan alguna información del proceso. Gotloib y cols.<sup>60</sup> utilizaron un modelo de exposición peritoneal en ratas mediante inyección, para demostrar que los agentes osmóticos empleados en el estudio, utilizados en los líquidos de diálisis, reducen la repoblación de las células mesoteliales. Debido a este fenómeno, se produce una cicatrización anómala con tejido fibrótico granular. Por otra parte, gracias a diversos estudios utilizando distintos modelos de animales, se sabe que el deterioro del peritoneo causado por la DP es reversible<sup>61,62</sup>.

El origen de las células mesoteliales en la repoblación del peritoneo no está muy claro. Existen evidencias<sup>63</sup> que sugieren que la repoblación de las células mesoteliales del peritoneo sea debida, por lo menos en parte, a la diferen-

ciación de células de tipo mesenquimal en células mesoteliales.

Más estudios son necesarios para el entendimiento de los mecanismos involucrados en la regeneración peritoneal. El entendimiento de la cinética y la importancia de los eventos involucrados en la recuperación del peritoneo podrá contribuir de un modo muy beneficioso a la planificación de estrategias que permitan reducir los efectos deletéreos que sufren los pacientes en DP.

## ESTUDIOS FUTUROS

El conocimiento de los mecanismos involucrados en el daño peritoneal causado por la exposición a los líquidos de diálisis permitirá el desarrollo de líquidos mejores y de terapias eficientes para prevenir, retardar y/o tratar los efectos deletéreos de la DP. Los estudios de los procesos que tienen lugar en los pacientes sometidos a la DP son prácticamente imposibles debido a la dificultad de obtención de muestras durante el transcurso del desarrollo de la patología. Ésto hace de los modelos animales una herramienta imprescindible a la hora de abordar los mecanismos del deterioro peritoneal, ya que éstos pueden ser planificados, y la toma de muestras no presenta una limitación. Gracias a ello se podrán conocer cuáles son los diferentes procesos que desembocan en el deterioro peritoneal, así como la relación entre los mismos y su aparición en el proceso patológico. Para poder diseccionar los distintos eventos que tienen lugar en el peritoneo durante la DP, el uso de animales modificados genéticamente (*knockout*, *knockin* y transgénicos) será de una gran ayuda, ya que permitirá conocer con exactitud la acción de los diversos genes implicados. Esta tecnología podría desembocar en la creación de una nueva generación de tratamientos con diana en genes específicos implicados en el proceso de deterioro peritoneal.

Otra alternativa que presenta buenas expectativas en un futuro cercano es el empleo de células progenitoras o trasplante de células mesoteliales autólogas como terapia a la descamación y deterioro que sufre la membrana peritoneal. Existen evidencias a favor de que este tipo de tratamientos puede ser útil como terapia. Se trata de estudios en los que la trasplantación de células mesoteliales autólogas ha sido eficiente para la prevención de adherencias<sup>64,65</sup>. Esto sugiere que la trasplantación de células mesoteliales podría ser una forma de prolongar o restablecer la función peritoneal, revirtiendo los efectos deletéreos provocados por la denudación de las células mesoteliales y el consiguiente engrosamiento de la capa submesotelial.



## BIBLIOGRAFÍA

- Di Paolo N, Sacchi G. Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int*. 2000;20 Suppl 3:S5-96.
- Mateijsen MA, van der Wal AC, Hendriks PM, Zweers MM, Mulder J, Struijk DG, et al. Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int*. 1999 Nov-Dec;19(6):517-25.
- Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Feb;13(2):470-9.
- Correale J, Farez M, Gilmore W. Vaccines for multiple sclerosis: progress to date. *CNS drugs*. 2008;22(3):175-98.
- Serreze DV, Chen YG. Of mice and men: use of animal models to identify possible interventions for the prevention of autoimmune type 1 diabetes in humans. *Trends Immunol*. 2005 Nov;26(11):603-7.
- Cespedes MV, Casanova I, Parreno M, Mangues R. Mouse models in oncogenesis and cancer therapy. *Clin Transl Oncol*. 2006 May;8(5):318-29.
- Mitsiades CS, Mitsiades NS, Richardson PG, Munshi NC, Anderson KC. Multiple myeloma: a prototypic disease model for the characterization and therapeutic targeting of interactions between tumor cells and their local microenvironment. *Journal of cellular biochemistry*. 2007 Jul 1;101(4):950-68.
- Dehoux JP, Gianello P. The importance of large animal models in transplantation. *Front Biosci*. 2007;12:4864-80.
- Vallabhajosyula P, Griesemer A, Yamada K, Sachs DH. Vascularized composite islet-kidney transplantation in a miniature swine model. *Cell biochemistry and biophysics*. 2007;48(2-3):201-7.
- Jamieson BD, Aldrovandi GM, Zack JA. The SCID-hu mouse: an in-vivo model for HIV-1 pathogenesis and stem cell gene therapy for AIDS. *Seminars in immunology*. 1996 Aug;8(4):215-21.
- Honda K, Hamada C, Nakayama M, Miyazaki M, Sherif AM, Harada T, et al. Impact of uremia, diabetes, and peritoneal dialysis itself on the pathogenesis of peritoneal sclerosis: a quantitative study of peritoneal membrane morphology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008 May;3(3):720-8.
- Jiménez-Heffernan J, C P, M AB, M LP, G DP, L A, et al. Tissue distribution of hyalinizing vasculopathy lesions in peritoneal dialysis patients An autopsy study. *Pathol Res Pract* 2008; epub.
- Zareie M, De Vriese AS, Hekking LH, ter Wee PM, Schalkwijk CG, Driesprong BA, et al. Immunopathological changes in a uraemic rat model for peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Jul;20(7):1350-61.
- Mortier S, Lameire NH, De Vriese AS. Animal models in peritoneal dialysis research: a need for consensus. *Perit Dial Int*. 2005 Jan-Feb;25(1):16-24.
- Peng WX, Guo QY, Liu SM, Liu CZ, Lindholm B, Wang T. Comparison of three chronic dialysis models. *Adv Perit Dial*. 2000;16:51-4.
- Litbarg NO, Gudehithlu KP, Sethupathi P, Arruda JA, Dunea G, Singh AK. Activated omentum becomes rich in factors that promote healing and tissue regeneration. *Cell Tissue Res*. 2007 Jun;328(3):487-97.
- Pawlaczyk K, Kuzlan-Pawlaczyk M, Anderstam B, Heimburger O, Bergstrom J, Waniewski J, et al. Effects of intraperitoneal heparin on peritoneal transport in a chronic animal model of peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Mar;16(3):669-71.
- Pecoits-Filho RF, Twardowski ZJ, Khanna R, Kim YL, Goel S, Moore H. The effect of antibiotic prophylaxis on the healing of exit sites of peritoneal dialysis catheters in rats. *Perit Dial Int*. 1998 Jan-Feb;18(1):60-3.
- Wieczorowska-Tobis K, Polubinska A, Wisniewska J, Pawlaczyk K, Kuzlan-Pawlaczyk M, Filas V, et al. Multidirectional approach to study peritoneal dialysis fluid biocompatibility in a chronic peritoneal dialysis model in the rat. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Mar;16(3):655-6.
- Flessner MF, Credit K, Henderson K, Vanpelt HM, Potter R, He Z, et al. Peritoneal changes after exposure to sterile solutions by catheter. *J Am Soc Nephrol*. 2007 Aug;18(8):2294-302.
- Di Paolo N, Garosi G, Petrini G, Traversari L, Rossi P. Peritoneal dialysis solution biocompatibility testing in animals. *Perit Dial Int*. 1995;15(7 Suppl):S61-9; discussion S9-70.
- Rubin J, Clawson M, Planch A, Jones Q. Measurements of peritoneal surface area in man and rat. *The American journal of the medical sciences*. 1988 May;295(5):453-8.
- Struijk DG, Douma CE, Krediet RT, Zweers MM. Nitric oxide-related experiments on peritoneal solute transport in the rabbit. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Mar;16(3):661-3.
- Zunic-Bozinovski S, Lausevic Z, Krstic S, Jovanovic N, Trbojevic-Stankovic J, Stojimirovic B. An experimental, non-uremic rabbit model of peritoneal dialysis. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*. 2008;57(2):253-60.
- Fracasso A, Baggio B, Ossi E, Del Prete D, Bonfante L, Bazzato G, et al. Glycosaminoglycans prevent the functional and morphological peritoneal derangement in an experimental model of peritoneal fibrosis. *Am J Kidney Dis*. 1999 Jan;33(1):105-10.
- Mortier S, Lameire NH, De Vriese AS. The effects of peritoneal dialysis solutions on peritoneal host defense. *Perit Dial Int*. 2004 Mar-Apr;24(2):123-38.
- De Vriese AS, Mortier S, Cornelissen M, Palmans E, Vanacker NJ, Leyssens A, et al. The effects of heparin administration in an animal model of chronic peritoneal dialysis exposure. *Perit Dial Int*. 2002 Sep-Oct;22(5):566-72.
- Martin-Martinez MD, Stoenoiu M, Verkaeren C, Devuyt O, Delporte C. Recombinant adenovirus administration in rat peritoneum: endothelial expression and safety concerns. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 May;19(5):1293-7.
- Ni J, Cnops Y, Debaix H, Boide I, Verbavatz JM, Devuyt O. Functional and molecular characterization of a peritoneal dialysis model in the C57BL/6J mouse. *Kidney Int*. 2005 May;67(5):2021-31.
- Shin SK, Kamerath CD, Gilson JF, Leyboldt JK. Effects of anaesthesia on fluid and solute transport in a C57BL6 mouse model of peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Oct;21(10):2874-80.
- Ni J, Verbavatz JM, Rippe A, Boide I, Moulin P, Rippe B, et al. Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis. *Kidney Int*. 2006 May;69(9):1518-25.
- Schwenger V, Morath C, Salava A, Amann K, Seregin Y, Deppisch R, et al. Damage to the peritoneal membrane by glucose degradation products is mediated by the receptor for advanced

- glycation end-products. *J Am Soc Nephrol*. 2006 Jan;17(1):199-207.
33. Mutsaers SE. Mesothelial cells: their structure, function and role in serosal repair. *Respirology* (Carlton, Vic). 2002 Sep;7(3):171-91.
  34. Nagy JA. Peritoneal membrane morphology and function. *Kidney Int Suppl*. 1996 Nov;56:S2-11.
  35. Yung S, Chan TM. Mesothelial cells. *Perit Dial Int*. 2007 Jun;27 Suppl 2:S110-5.
  36. Rippe A, Rippe C, Sward K, Rippe B. Disproportionally low clearance of macromolecules from the plasma to the peritoneal cavity in a mouse model of peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2007 Jan;22(1):88-95.
  37. Pawlaczyk K, Garcia-Lopez E, Kuzlan-Pawlaczyk M, Heimbürger O, Bergström J, Breborowicz A, et al. The effect of icodextrin-based solutions on peritoneal transport in rats undergoing chronic peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 2001;21 Suppl 3:S359-61.
  38. Garcia-Lopez E, Pawlaczyk K, Anderstam B, Qureshi AR, Kuzlan-Pawlaczyk M, Heimbürger O, et al. Icodextrin metabolism and alpha-amylase activity in nonuremic rats undergoing chronic peritoneal dialysis. *Perit Dial Int*. 2007 Jul-Aug;27(4):415-23.
  39. Gillerot G, Devuyst O. Molecular mechanisms modifying the peritoneal membrane exposed to peritoneal dialysis. *Clinical nephrology*. 2003 Jul;60(1):1-6.
  40. Margetts PJ, Churchill DN. Acquired ultrafiltration dysfunction in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Nov;13(11):2787-94.
  41. Margetts PJ, Kolb M, Yu L, Hoff CM, Holmes CJ, Anthony DC, et al. Inflammatory cytokines, angiogenesis, and fibrosis in the rat peritoneum. *Am J Pathol*. 2002 Jun;160(6):2285-94.
  42. Bazargani F. Acute inflammation in peritoneal dialysis: experimental studies in rats. Characterization of regulatory mechanisms. *Swed Dent J Suppl*. 2005(171):1-57, i.
  43. Ni J, Moulin P, Gianello P, Feron O, Balligand JL, Devuyst O. Mice that lack endothelial nitric oxide synthase are protected against functional and structural modifications induced by acute peritonitis. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Dec;14(12):3205-16.
  44. De Vriese AS, Flyvbjerg A, Mortier S, Tilton RG, Lameire NH. Inhibition of the interaction of AGE-RAGE prevents hyperglycemia-induced fibrosis of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol*. 2003 Aug;14(8):2109-18.
  45. Zareie M, van Lambalgen AA, ter Wee PM, Hekking LH, Keuning ED, Schadee-Eestermans IL, et al. Better preservation of the peritoneum in rats exposed to amino acid-based peritoneal dialysis fluid. *Perit Dial Int*. 2005 Jan-Feb;25(1):58-67.
  46. van Westrhenen R, Zweers MM, Kunne C, de Waart DR, van der Wal AC, Krediet RT. A pyruvate-buffered dialysis fluid induces less peritoneal angiogenesis and fibrosis than a conventional solution. *Perit Dial Int*. 2008 Sep-Oct;28(5):487-96.
  47. Fabbrini P, Zareie M, Ter Wee PM, Keuning ED, Beelen RH, van den Born J. Peritoneal exposure model in the rat as a tool to unravel bio(in)compatibility of PDF. *Nephrol Dial Transplant*. 2006 Jul;21 Suppl 2:ii8-11.
  48. Zareie M, Hekking LH, Welten AG, Driesprong BA, Schadee-Eestermans IL, Faict D, et al. Contribution of lactate buffer, glucose and glucose degradation products to peritoneal injury *in vivo*. *Nephrol Dial Transplant*. 2003 Dec;18(12):2629-37.
  49. Carlsson O, Nielsen S, Zakaria el R, Rippe B. *In vivo* inhibition of transcellular water channels (aquaporin-1) during acute peritoneal dialysis in rats. *Am J Physiol*. 1996 Dec;271(6 Pt 2):H2254-62.
  50. Ferrier ML, Combet S, van Landschoot M, Stoenoiu MS, Cnops Y, Lameire N, et al. Inhibition of nitric oxide synthase reverses changes in peritoneal permeability in a rat model of acute peritonitis. *Kidney Int*. 2001 Dec;60(6):2343-50.
  51. De Vriese AS, Tilton RG, Stephan CC, Lameire NH. Vascular endothelial growth factor is essential for hyperglycemia-induced structural and functional alterations of the peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Aug;12(8):1734-41.
  52. Margetts PJ, Kolb M, Galt T, Hoff CM, Shockley TR, Gaudie J. Gene transfer of transforming growth factor-beta1 to the rat peritoneum: effects on membrane function. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Oct;12(10):2029-39.
  53. Sjolund JA, Smith Pedersen R, Jespersen J, Gram J. Intraperitoneal heparin reduces peritoneal permeability and increases ultrafiltration in peritoneal dialysis patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2004 May;19(5):1264-8.
  54. Peng H, Cheung AK, Reimer LG, Kamerath CD, Leypoldt JK. Effect of indomethacin on peritoneal protein loss in a rabbit model of peritonitis. *Kidney Int*. 2001 Jan;59(1):44-51.
  55. Zemel D, Struijk DG, Dinkla C, Stolk LM, ten Berge IJ, Krediet RT. Effects of intraperitoneal cyclooxygenase inhibition on inflammatory mediators in dialysate and peritoneal membrane characteristics during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med*. 1995 Aug;126(2):204-15.
  56. Douma CE, de Waart DR, Zemel D, Struijk DG, Krediet RT. Prostaglandin inhibition by intraperitoneal indomethacin has no effect on peritoneal permeability during stable CAPD. *Nephrol Dial Transplant*. 2001 Apr;16(4):803-8.
  57. Zareie M, Tangelder GJ, ter Wee PM, Hekking LH, van Lambalgen AA, Keuning ED, et al. Beneficial effects of aminoguanidine on peritoneal microcirculation and tissue remodelling in a rat model of PD. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Dec;20(12):2783-92.
  58. Lee EA, Oh JH, Lee HA, Kim SI, Park EW, Park KB, et al. Structural and functional alterations of the peritoneum after prolonged exposure to dialysis solutions: role of aminoguanidine. *Perit Dial Int*. 2001 May-Jun;21(3):245-53.
  59. Miyoshi H, Taguchi T, Sugiura M, Takeuchi M, Yanagisawa K, Watanabe Y, et al. Aminoguanidine pyridoxal adduct is superior to aminoguanidine for preventing diabetic nephropathy in mice. Hormone and metabolic research Hormon- und Stoffwechselforschung. 2002 Jul;34(7):371-7.
  60. Gotloib L, Wajsbrot V, Shostak A, Kushnir R. Population analysis of mesothelium *in situ* and *in vivo* exposed to bicarbonate-buffered peritoneal dialysis fluid. *Nephron*. 1996;73(2):219-27.
  61. Kim YL, Kim SH, Kim JH, Kim SJ, Kim CD, Cho DK, et al. Effects of peritoneal rest on peritoneal transport and peritoneal membrane thickening in continuous ambulatory peritoneal dialysis rats. *Perit Dial Int*. 1999;19 Suppl 2:S384-7.
  62. Zareie M, Keuning ED, ter Wee PM, Beelen RH, van den Born J. Peritoneal dialysis fluid-induced changes of the peritoneal membrane are reversible after peritoneal rest in rats. *Nephrol Dial Transplant*. 2005 Jan;20(1):189-93.
  63. Nishioka Y, Miyazaki M, Abe K, Furusu A, Harada T, Ozono Y, et al. Regeneration of peritoneal mesothelium in a rat model of peritoneal fibrosis. *Renal failure*. 2008;30(1):97-105.
  64. Bertram P, Tietze L, Hoopmann M, Treutner KH, Mittermayer C, Schumpelick V. Intraperitoneal transplantation of isologous



- mesothelial cells for prevention of adhesions. *The European journal of surgery = Acta chirurgica*. 1999 Jul;165(7):705-9.
65. Takazawa R, Yamato M, Kageyama Y, Okano T, Kihara K. Mesothelial cell sheets cultured on fibrin gel prevent adhesion formation in an intestinal hernia model. *Tissue engineering*. 2005 Mar-Apr;11(3-4):618-25.
  66. Yatzidis H. Enhanced ultrafiltration in rabbits with bicarbonate glycylglycine peritoneal dialysis solution. *Perit Dial Int*. 1993;13(4):302-6.
  67. Garosi G, Gaggiotti E, Monaci G, Brardi S, Di Paolo N. Biocompatibility of a peritoneal dialysis solution with amino acids: histological evaluation in the rabbit. *Perit Dial Int*. 1998 Nov-Dec;18(6):610-9.
  68. Schambye HT, Flesner P, Pedersen RB, Hardt-Madsen M, Chemnitz J, Christensen HK, et al. Bicarbonate- versus lactate-based CAPD fluids: a biocompatibility study in rabbits. *Perit Dial Int*. 1992;12(3):281-6.
  69. Di Paolo N, Garosi G, Petrini G, Monaci G. Morphological and morphometric changes in mesothelial cells during peritoneal dialysis in the rabbit. *Nephron*. 1996;74(3):594-9.
  70. Musi B, Carlsson O, Rippe A, Wieslander A, Rippe B. Effects of acidity, glucose degradation products, and dialysis fluid buffer choice on peritoneal solute and fluid transport in rats. *Perit Dial Int*. 1998 May-Jun;18(3):303-10.
  71. Mortier S, De Vriese AS, Van de Voorde J, Schaub TP, Passlick-Deetjen J, Lameire NH. Hemodynamic effects of peritoneal dialysis solutions on the rat peritoneal membrane: role of acidity, buffer choice, glucose concentration, and glucose degradation products. *J Am Soc Nephrol*. 2002 Feb;13(2):480-9.
  72. Hekking LH, Zareie M, Driesprong BA, Faict D, Welten AG, de Greeuw I, et al. Better preservation of peritoneal morphologic features and defense in rats after long-term exposure to a bicarbonate/lactate-buffered solution. *J Am Soc Nephrol*. 2001 Dec;12(12):2775-86.
  73. Mortier S, De Vriese AS, McLoughlin RM, Topley N, Schaub TP, Passlick-Deetjen J, et al. Effects of conventional and new peritoneal dialysis fluids on leukocyte recruitment in the rat peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol*. 2003 May;14(5):1296-306.
  74. Suzuki K, Khanna R, Nolph KD, Moore HL, Twardowski ZJ. Effects of bicarbonate dialysis solution on peritoneal transport in rats. *Adv Perit Dial*. 1996;12:24-6.
  75. Wieczorowska-Tobis K, Korybalska K, Polubinska A, Radkowski M, Breborowicz A, Montagne A, et al. Long-term effects of glycylglycine peritoneal dialysis solution with neutral pH on peritoneum in rats. *Adv Perit Dial*. 1997;13:42-6.
  76. Pawlaczyk K, Kuzlan-Pawlaczyk M, Wieczorowska-Tobis K, Polubinska A, Wisniewska J, Faict D, et al. Bicarbonate/lactate dialysis solution improves *in vivo* function of peritoneal host defense in rats. *Perit Dial Int*. 1999;19 Suppl 2:S370-7.
  77. Park MS, Kim JK, Holmes C, Weiss MF. Effects of bicarbonate/lactate solution on peritoneal advanced glycosylation end-product accumulation. *Perit Dial Int*. 2000;20 Suppl 5:S33-8.

- **IV.1.2.- Caracterización y desarrollo del modelo: Apartados IV.1.2.1. y IV.1.2.2.**

Debido a las necesidades del estudio, que no podían cubrirse con los modelos preexistentes, fue necesario el diseño y desarrollo de un nuevo modelo animal de daño peritoneal por exposición a LD a largo plazo. Consiste en la instilación de un LD (idéntico al empleado en pacientes) en la cavidad peritoneal a través de un catéter. Aquí se detallan las características del catéter utilizado y la cirugía realizada para implantarlo en los animales. El catéter está conectado a un puerto de acceso subcutáneo a través del cual se inyecta el LD. Para ser utilizado en el estudio del deterioro de la membrana peritoneal, el modelo en ratón debe causar efectos semejantes a los observados en los pacientes: fibrosis/engrosamiento, fallo de la capacidad de UF, angiogénesis y EMT de las células mesoteliales.

En el apartado IV.1.2.1 analizamos los tres primeros efectos. Observamos un aumento del grosor de la membrana con el tratamiento, disminución del volumen extraído y un aumento del número de vasos por campo. A continuación en el apartado IV.1.2.2 estudiamos la aparición EMT. En humanos existen evidencias de la aparición de EMT de las células mesoteliales tanto en biopsias peritoneales<sup>129</sup> como *ex vivo* en cultivos de células mesoteliales drenadas en efluente de diálisis<sup>71</sup>. Observamos en biopsias peritoneales de los ratones la aparición de células con características compartidas de fibroblastos y de células mesoteliales embebidas en la matriz. Esto sugiere que estas células puedan haberse formado como consecuencia de un proceso de EMT a partir de células originariamente mesoteliales, las cuales habrían formado parte de la monocapa mesotelial que recubre la membrana peritoneal. Estas células, sometidas reiteradamente a determinados estímulos, pueden descamarse de la membrana, dejando espacios desnudos en los que la matriz extracelular queda expuesta a la luz de la cavidad peritoneal, o adquirir capacidades migratorias e invasivas y desarrollar características miofibroblastoides. Por este motivo observamos más evidencias de EMT en zonas desprovistas de células mesoteliales en la superficie de la membrana. La aparición de este fenómeno en los ratones confirma definitivamente la gran similitud presente entre los daños observados en el peritoneo de pacientes de DP y el de estos animales, validando su utilidad como modelo de experimentación.



➤ **IV.1.2.1.- Exposición crónica del peritoneo de ratón a LD: alteraciones estructurales y funcionales de la membrana peritoneal.**

*Peritoneal Dialysis International*, Vol. 29, pp. 227–233  
Printed in Canada. All rights reserved.

0896-8608/09 \$3.00 + .00  
Copyright © 2009 International Society for Peritoneal Dialysis

## SHORT REPORTS

### **Chronic Exposure of Mouse Peritoneum to Peritoneal Dialysis Fluid: Structural and Functional Alterations of the Peritoneal Membrane**

An alternative to hemodialysis, peritoneal dialysis (PD) is a form of renal replacement therapy based on the use of the peritoneum as a semipermeable membrane across which ultrafiltration and diffusion take place (1). Permanent exposure to bioincompatible PD fluids (PDFs) and episodes of infections cause inflammation and injury to the peritoneal membrane (PM), which progressively undergoes fibrosis and angiogenesis, and ultimately its dialytic capacity fails (1). The pathophysiologic mechanisms involved in PM deterioration are still poorly understood. However, it is known that myofibroblasts play important roles in inflammatory response, extracellular matrix accumulation, and angiogenesis (2,3). Animal models have added important insight into understanding the pathogenesis of membrane failure. The rat model is the most commonly employed to study fibrosis (4), fluid biocompatibility (5,6), and inflammation (7), but it has not improved our knowledge of mechanisms involved in peritoneal damage. The utilization of genetically manipulated mice creates the possibility of better dissection of the mechanisms involved in PD-induced peritoneal damage and ultrafiltration failure (8). The aim of the present work is the development of a mouse model of chronic PM exposure to PDF instilled through a catheter. The results demonstrate that daily exposure of mouse peritoneum to PDF induces morphological and functional alterations of the PM similar to those observed in PD patients, demonstrating that this model is suitable to study the mechanisms involved in PDF-induced peritoneal damage.

#### **MATERIAL AND METHODS**

*Experimental Animals, Surgery, and Exposure to PDF:* This study was performed in nonuremic female C57BL/6 mice ( $n = 35$ , age 12–14 weeks; Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain). The dropout percentage in our two experimental groups was 30%; dropout was due

mainly to catheter displacement, trapping, and hemo-peritoneum. The mice were housed under standard conditions and with free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Review Committee of the Unidad de Cirugía Experimental of Hospital La Paz, Madrid. During the experiment, the health of the mice was checked daily by a veterinary doctor. The mice were weighed every week and those presenting more than 10% weight loss, any sign of port infection, or abnormal activity were excluded from the experiment. Following sacrifice, peritoneum was carefully examined for any sign of bleeding or infection.

*Catheter and Installation:* A customized vascular access port (ROP; Access Technologies, Skokie, IL, USA) was implanted into the mice. The catheters had 10 holes located within 1 cm of the tip to help the fluid exit and to prevent obstructions [Figure 1(a)]. The animals were anaesthetized with intraperitoneal 100 mg/kg ketamine and 10 mg/kg xylazine. Afterwards, we performed an incision in the skin in the right flank of the animal. The skin was separated from the muscle layer below. Through another incision in this second layer, we introduced the end of the catheter into the peritoneal cavity [Figure 1(b)]. The port was displaced at the subcutaneous space of the mouse's back [Figure 1(c)].

During the first week post surgery, 0.2 mL saline was instilled in order to prevent catheter trapping. Thereafter, during the experimental procedure, 1.5 mL standard PDF (lactate with 4.25% glucose; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) or physiologic saline solution was instilled daily for 5 weeks. This volume was chosen because it is almost equivalent to a single exchange in PD patients, relative to body weight, and does not affect mouse respiration. A third group, age matched and not manipulated, was used as control. On the last day of the study, in order to perform the functional analysis of the PM, we instilled PDF (1.5 mL) into the saline- and lactate-instilled groups. After 90 minutes, the mice were anesthetized by isoflurane inhalation and sacrificed by cervical dislocation. Total peritoneal fluid was collected and weighed on a precision balance to calculate drained volume. Peritoneal ultrafiltration capacity was determined by the percentage of peritoneal liquid recovered after 90 minutes.

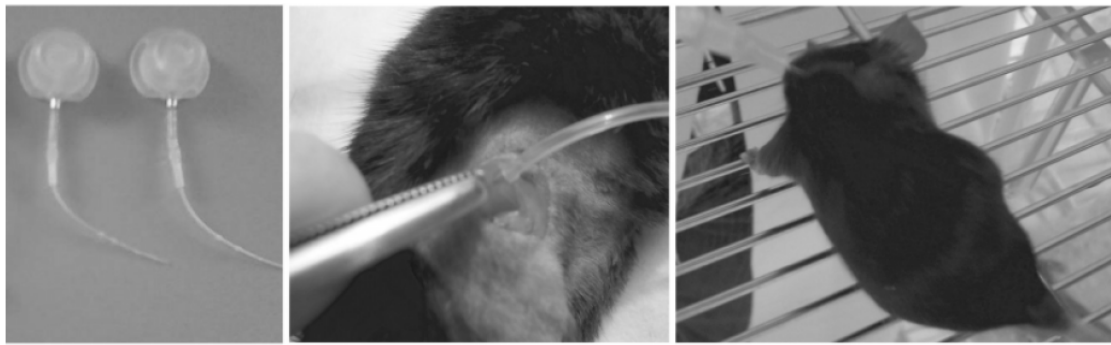


Figure 1 — Catheter installation and peritoneal dialysis fluid instillation in mice. The catheter contains 10 holes located within 1 cm of the tip to help the fluid exit and to prevent obstructions (A). The catheter installation surgical procedure consists of a small incision in the right flank, where the catheter is sutured (B). At the end of the procedure, the catheter port is located in the back of the mouse in the subcutaneous space (C).

**Histological Analyses:** Tissue collected from parietal and visceral peritoneum was fixed in neutral-buffered formalin, embedded in paraffin, and cut into 5- $\mu$ m sections. The sections were stained with hematoxylin & eosin and analyzed microscopically (Leica CTR6000, with a Leica Microsystems LAS-AF6000; Witzlar, Germany) to determine the thickness of the mesothelial layer. To determine the presence of blood vessels we stained the sections with anti-CD31 mAb (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) by immunohistochemistry. The thickness of the PM and the number of blood vessels were achieved as the median of seven measurements in different fields of each animal sample.

**Statistical Analysis:** Statistical analysis of data was performed using GraphPad Prism 4 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Comparison among groups was made with Mann-Whitney test. A  $p$  value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

Compared to non-manipulated mice, chronic instillation of PDF and saline induced thickening and inflammation of the submesothelial compact zone [Figure 2(a)]. The thickening of PM was due mainly to matrix collagen deposition and increased numbers of cells [Figure 2(c)]. Measurement of the submesothelial fibrotic stroma revealed that the PDF-instilled group had significantly increased peritoneal thickness compared with the saline-instilled group ( $p < 0.01$ ) [Figure 2(c)]. This demonstrates that instillation of peritoneal liquid induces morphological alterations in PM, as happens in patients submitted to PD. In mice, we observed a strong thickening of the mesothelial membrane in a relatively short period, probably because of the high metabolism of these

animals. No significant increase in thickness was observed in PM surrounding the intestines (data not shown). In addition to morphological changes, instillation of PDF also induced functional alterations in peritoneum. Chronic instillation of PDF induced alteration of membrane permeability since the quantity of PDF drained on the last day of the experiment was lower than that in mice chronically instilled with saline [Figure 2(d)]. Immunohistochemistry with anti-CD31 antibodies [Figure 2(b)] revealed that chronically instilled-PDF mice had a higher number of blood vessels at the submesothelial space than the saline-instilled mice [Figure 2(e)]. This strongly suggests that alterations in peritoneal permeability are dependent on angiogenesis at the submesothelial space. Again, this observation is in agreement with observations in patients submitted to PD, where the increase in the numbers of blood vessels plays an important role in PM transport rate and ultrafiltration failure (9).

The results presented here indicate that PM of mice chronically exposed to PDF suffers alterations similar to those observed in patients, and that this mouse model is suitable for the study of mechanisms involved in peritoneal deterioration. The use of an indwelling catheter for chronic instillation of PDF makes our model similar to PD in patient treatment and reduces the risk of infections and hemoperitoneum in chronic treatment. The surgery and catheter did not significantly affect the structure and function of PM. We observed that contact of the catheter with PM produced only localized inflammation and fibrosis, which did not affect peritoneal function. In order to prevent interference by catheter-induced damage in the analyses, we avoided taking samples from areas near the catheter.

This model provides a valuable tool to unravel the molecular basis of PM deterioration through the utiliza-



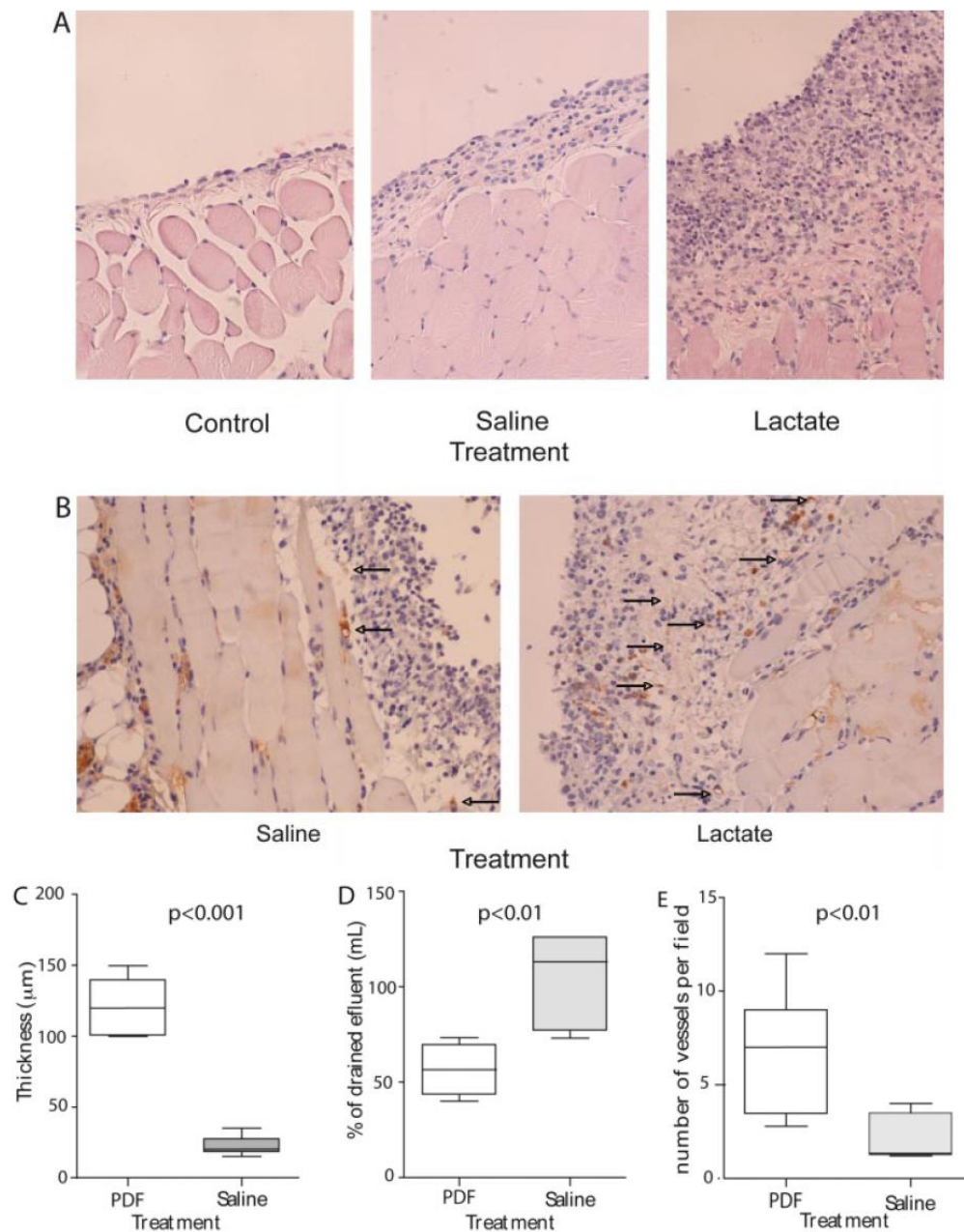


Figure 2 — Exposure to peritoneal dialysis fluid (PDF) induces morphological and functional alterations in the peritoneal membrane. After 5 weeks of fluid instillation, peritoneal biopsies were collected and stained with hematoxylin & eosin. Representative microphotographs of the control (no liquid instillation), saline-instilled, and PDF-instilled groups are shown (A). The staining of CD31-positive blood vessels of both experimental groups are also shown (B). Arrows indicate CD31-positive blood vessels. Structural measurements of the thickness of the submesothelial space reveal that PDF instillation induces thickening of the submesothelial space (C) ( $n = 14$  for PDF-instilled and  $n = 7$  for saline-instilled mice). Peritoneal function was determined as the percentage of peritoneal effluent recovered 90 minutes after instillation (D) ( $n = 8$  for PDF-instilled and  $n = 5$  for saline-instilled mice). The numbers of vessels per field of submesothelium were determined in biopsy stained with anti-CD31 (E) ( $n = 14$  for PDF-instilled and  $n = 7$  for saline-instilled mice).

tion of genetically manipulated mice, and will open the possibility of developing and establishing efficient new therapies.

#### DISCLOSURE

The authors declare that no financial conflict of interest exists.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2007-61201 (Ministerio de Educación y Ciencia) to M. López-Cabrera, FIS PI 06/0098 and RETICS 06/0016 to R. Selgas, and FIS PI050618 to M.A. Bajo. G.T. González-Mateo received financial support from Gambro Europe.

We thank Javier B. de la Víbora (DVM) and Carlota L. Aramburu (DVM, PhD) for their assistance with the care of the mice.

Guadalupe T. González-Mateo<sup>1</sup>  
Jesús Loureiro<sup>2</sup>  
José A. Jiménez-Heffernan<sup>3</sup>  
M.-Auxiliadora Bajo<sup>1</sup>  
Rafael Selgas<sup>1</sup>  
Manuel López-Cabrera<sup>2,4a</sup>  
Luiz S. Aroeira<sup>1a\*</sup>

Unidad de Investigación y Servicio de Nefrología<sup>1</sup>  
Hospital Universitario de la Paz  
Unidad de Biología Molecular<sup>2</sup>  
Hospital Universitario de la Princesa  
Hospital Universitario Puerta de Hierro<sup>3</sup>  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa<sup>4</sup>  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Red Española de Investigación Renal (REDinREN)  
del Instituto de Salud Carlos III, RETICS 06/0016  
Madrid, Spain

\*e-mail: lstark.hlpr@salud.madrid.org

#### REFERENCES

1. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55:341-56.
2. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, et al. Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348:403-13.
3. Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, et al. Immunohistochemical char-

acterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; 444:247-56.

4. Wieczorowska K, Khanna R, Moore HL, Nolph KD, Twardowski ZJ. Rat model of peritoneal fibrosis: preliminary observations. *Adv Perit Dial* 1995; 11:48-51.
5. Hekking LH, Zareie M, Driesprong BA, Faict D, Welten AG, de Greeuw I, et al. Better preservation of peritoneal morphologic features and defense in rats after long-term exposure to a bicarbonate/lactate-buffered solution. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12:2775-86.
6. Zareie M, Hekking LH, Welten AG, Driesprong BA, Schadee-Eestermans IL, Faict D, et al. Contribution of lactate buffer, glucose and glucose degradation products to peritoneal injury in vivo. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:2629-37.
7. Mortier S, Lameire NH, De Vriese AS. The effects of peritoneal dialysis solutions on peritoneal host defense. *Perit Dial Int* 2004; 24:123-38.
8. Nishino T, Ni J, Devuyst O. Transgenic mouse models. *Perit Dial Int* 2007; 27:625-33.
9. Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, et al. Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 2002; 13:470-9.

### Evolution of Gram-Negative Bacilli Susceptibility in Peritoneal Dialysis-Related Peritonitis in Brazil: a Single Center's Experience Over Nine Years

In recent years, the prevalence of coagulase-negative staphylococci and *Staphylococcus aureus* as etiologies of peritoneal dialysis-related peritonitis has progressively diminished (1,2). Possibly, advances in connectology and the widespread use of mupirocin have contributed to this condition (1). In contrast, the prevalence of gram-negatives has not decreased despite medical and technological advances (1,2). In fact, some authors have reported that gram-negatives are the most frequent etiologic agents of peritoneal infections (3,4).

Gram-negative peritonitis, particularly those due to *Pseudomonas aeruginosa*, in general evolve with persistent infection and a high method failure rate (3,5,6). Because of the current high proportion of these cases and the gradual increase in bacterial resistance to several antibiotics (7), the choice of therapeutic regimen is an important challenge for nephrologists. According to the 2005 ISPD guidelines (8), local evaluation of bacterial resistance plays a crucial role in the choice of antibiotic for empirical treatment of peritonitis.

The purpose of the present study was to describe the evolution of gram-negative antibiotic susceptibility over

<sup>a</sup> These two authors contributed equally to this work.



➤ **IV.1.2.2. Caracterización de la transición epitelio-mesénquimal de células mesoteliales en un modelo en ratón de exposición peritoneal crónica a LD con alto contenido en glucosa.**

Experimental Encapsulating Peritoneal Sclerosis  
*Peritoneal Dialysis International*, Vol. 28 (2008), Supplement 5  
 Printed in Canada. All rights reserved.

0896-8608/08 \$3.00 + .00  
 Copyright © 2008 International Society for Peritoneal Dialysis

## CHARACTERIZATION OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION OF MESOTHELIAL CELLS IN A MOUSE MODEL OF CHRONIC PERITONEAL EXPOSURE TO HIGH GLUCOSE DIALYSATE

Luiz S. Aroeira,<sup>1</sup> Jesús Loureiro,<sup>2</sup> Guadalupe T. González-Mateo,<sup>1</sup> Vanessa Fernandez-Millara,<sup>1</sup> Gloria del Peso,<sup>1</sup> José Antonio Sánchez-Tomero,<sup>3</sup> Marta Ruiz-Ortega,<sup>4</sup> M. Auxiliadora Bajo,<sup>1</sup> Manuel López-Cabrera,<sup>2,5</sup> and Rafael Selgas<sup>1a</sup>

*Unidad de Investigación and Servicio de Nefrología,<sup>1</sup> Hospital Universitario La Paz; Unidad de Biología Molecular<sup>2</sup> and Servicio de Nefrología,<sup>3</sup> Hospital Universitario de la Princesa; Laboratory of Renal and Vascular Research,<sup>4</sup> Fundación Jiménez Díaz; Centro de Biología Molecular Severo Ochoa,<sup>5</sup> CSIC-UAM, Cantoblanco, Madrid, Spain*

**Animal models of peritoneal dialysis fluid (PDF) exposure are key tools in the study of mechanisms involved in alterations of the peritoneal membrane and in the design of therapies. We recently developed a mouse model of chronic peritoneal exposure to high glucose dialysate. Herein, we make a sequential analysis of the effects of glucose-based PDF on mouse peritoneal membrane and on mesothelium. We demonstrate that chronic exposure to PDF induces thickness and fibrosis of the peritoneal membrane in a time-dependent manner. We also show that mesothelial cells progressively detach and lose cytokeratin expression. In addition, we demonstrate that some mesothelial cells invade the submesothelial space, where they appear as cytokeratin- and alpha-smooth muscle actin-positive cells. These findings demonstrate that epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of mesothelial cells takes place in mouse peritoneum exposed to PDF, validating this model for the study of effects of drugs on the EMT process as a therapy for peritoneal deterioration.**

*Perit Dial Int* 2008; 28(S5):S29–S33 [www.PDConnect.com](http://www.PDConnect.com)

**KEY WORDS:** Mesothelial cell; epithelial-to-mesenchymal transition; mice model of peritoneal dialysis.

**P**eritoneal dialysis (PD) has become an established alternative to hemodialysis for the treatment of end-stage renal disease. The peritoneal membrane (PM) is used as a semipermeable membrane to obtain ultrafiltration and diffusion. Prolonged exposure to a solution containing a high concentration of glucose and having a low pH, together with episodes of peritoneal infections and hemoperitoneum, cause PM to deteriorate. Mesothelial cell (MC) denudation, fibrosis, and neovasculariza-

tion are the successive morphological alterations suffered by the PM (1). Such structural alterations are the major cause of ultrafiltration failure and encapsulating peritonitis (1).

We have demonstrated that effluent-derived MCs cultured *ex vivo* show progressive loss of their epithelial phenotype and acquire a fibroblast-like phenotype on extension of PD. In addition, these cells acquire the expression of alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA), characteristic of a myofibroblast nature (2). Immunohistochemical analysis of peritoneal biopsies from PD patients demonstrated the presence of mesothelial markers in stromal  $\alpha$ SMA-positive myofibroblasts, suggesting that these cells could originate from the local conversion of MCs via epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) (3). There is emerging evidence supporting the idea that the EMT of MCs plays an important role in the onset of PM deterioration (1). The production of extracellular matrix components and large amounts of vascular endothelial growth factor by transdifferentiated MCs (4) may induce vasodilation, hyperpermeability, high solute transport, rapid disappearance of glucose osmotic gradient, poor ultrafiltration capacity, and, later on, angiogenesis (5). Upon *in vitro* stimulation with inflammatory cytokines, omentum-derived MCs also suffer functional and morphological alterations similar to those observed *in vivo* (2).

Animal models contribute to our understanding of the mechanisms involved in the response to PD. We recently developed a mouse model of PD in which exposure to

<sup>a</sup> All the authors belong to the Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas.

Correspondence to: R. Selgas, Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz, Castellana, 261, 28046, Madrid, Spain.

[rselgas.hulp@salud.madrid.org](mailto:rselgas.hulp@salud.madrid.org)

classic glucose-based peritoneal dialysis fluids (PDF) induced fibrosis and angiogenesis of PM in 5 weeks of treatment (unpublished observation). These morphological alterations were accompanied by ultrafiltration failure of mouse PM. In that work we addressed the effect of chronic exposure to PDF on mouse PM in the context of EMT of MCs. Our data demonstrated that this animal model will provide a valuable tool to unravel the molecular basis of PM deterioration and to study the anti-EMT effects of drugs as therapy for peritoneal deterioration.

## MATERIAL AND METHODS

### EXPERIMENTAL ANIMALS, SURGERY, AND PDF EXPOSURE

This study was performed in nonuremic C57BL/6 female mice aged 12 – 14 weeks (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain). The mice were housed under standard conditions and with free access to food and water. The experimental protocol was approved by the Animal Ethics Review Committee of the Unidad de Cirugía Experimental of Hospital La Paz.

A customized vascular access port (mouse port; Access Technologies, Strategic Applications, Libertyville, Illinois, USA) was implanted in the mice. Catheters containing ten holes were located within 1 cm from the tip to help the fluid exit and to prevent obstructions. Animals were anesthetized intraperitoneally with ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Afterward, the end of catheter was introduced into the peritoneal cavity by the right flank of the animal and the port was displaced at the subcutaneous space of the mouse's back. During the first week post surgery, 0.2 mL saline was instilled in order to prevent catheter trapping. Thereafter, during the experimental procedure, 1.5 mL standard PDF with lactate and 4.25% glucose (Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) was instilled. A second group, age matched and not manipulated, was used as control.

During the experiment, the health of the mice was checked daily by the veterinarian. Mice were weighed every week and those presenting more than 10% weight loss or any sign of port infection or abnormal activity were excluded from the experiment. Following sacrifice, peritoneum was carefully examined for any sign of bleeding or infection.

### ANTIBODIES AND HISTOLOGICAL ANALYSES

For this study we used mouse anti-pan-cytokeratin and mouse anti- $\alpha$ SMA antibodies (Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). In order to avoid unspecific staining with secondary antibodies, these antibodies were

previously conjugated with specific Zenon fab (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacture's instructions.

We collected tissue from parietal peritoneum, fixed it in neutral-buffered formalin, and embedded it in paraffin, which we cut into 5- $\mu$ m sections. The sections were stained with Masson's trichrome for fibrosis detection and submesothelial layer thickness was determined microscopically (Leica CTR6000 with an LAS-AF6000; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). For the immunofluorescence analysis of MCs, samples were cut into 3- $\mu$ m sections and, after treating with xylol to remove the paraffin, samples were heated for 15 minutes. After that, samples were stained with anti-pan-cytokeratin and anti- $\alpha$ SMA Zenon conjugate. Nuclei were stained with DAPI. Micrography was performed using a fluorescence microscope (Leica CTR6000 with an LAS-AF6000).

### STATISTICAL ANALYSES

Statistical analysis of data was performed using GraphPad Prism 4 software (GraphPad, La Jolla, California, USA). Comparison among groups was made using the Mann-Whitney test. A *p* value of less than 0.05 was considered statistically significant.

## RESULTS

### EXPOSURE TO PDF INDUCES PERITONEAL FIBROSIS

We have previously demonstrated that chronic exposure to conventional glucose-based PDF induces fibrosis in mouse PM. In order to better understand the mechanism of peritoneal damage in this model, we analyzed progression of peritoneal thickening against time of peritoneal exposure to dialysis solution.

Thickness of PM increased with time of exposure to dialysis solution [Figure 1(a)]. Quantitative analysis demonstrated that this increment was significant at the second week of treatment [Figure 1(b)].

### MESOTHELIAL CELLS ARE DETACHED DURING PDF TREATMENT AND LOSE CYTOKERATIN EXPRESSION

To analyze the effect of dialysis solution exposure on mice MCs, we stained these cells with anti-cytokeratin and myofibroblasts with anti- $\alpha$ SMA antibodies. Before starting dialysis solution instillation, the PM showed a continuous layer of cytokeratin-positive MCs, properly positioned. Two weeks after PDF instillation, the mesothelium showed evidence of MC loss. At day 30, fill cells of PM were positive for cytokeratin. In addition, we ob-



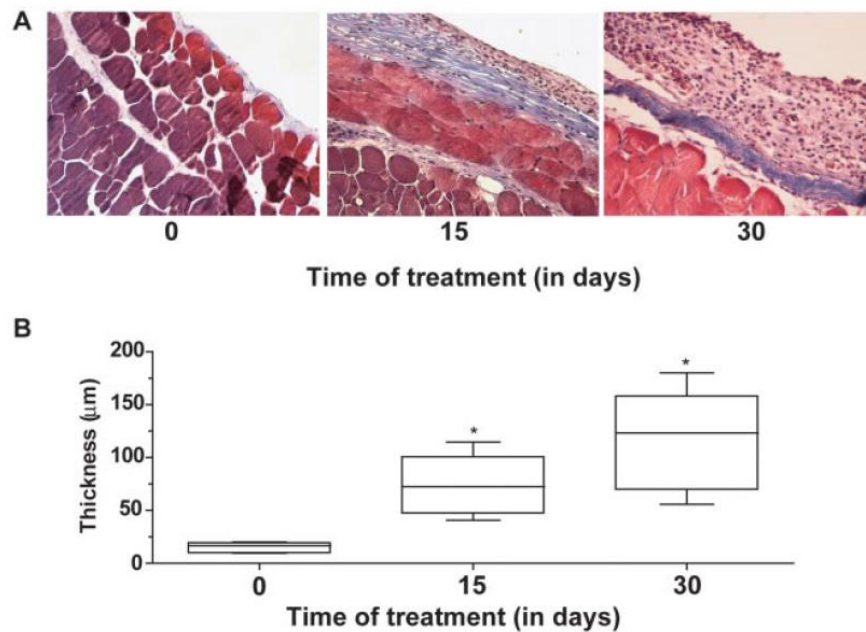


Figure 1 — Chronic exposure to peritoneal dialysis fluid results in increased deposition of extracellular matrix (A) and thickness (B) of the peritoneal membrane in a time-dependent manner. Comparisons between times of observations were performed using the nonparametric Mann-Whitney test. \* $p < 0.01$ .

served dull cytokeratin-positive cells embedded in the submesothelial compact zone. This suggests that MCs are not only denuding but are also migrating to the submesothelial space (Figure 2).

#### MESOTHELIAL CELLS UNDERGO EMT IN RESPONSE TO CHRONIC EXPOSURE TO PDF

We have previously described the presence of cytokeratin- and  $\alpha$ SMA-positive cells embedded in the

submesothelial space in peritoneal biopsies from PD patients, suggesting that these cells stem from the conversion of MCs into myofibroblasts (3). In order to determine the presence of transdifferentiated MCs in the submesothelial space of mice exposed to dialysis solution, we performed an analysis at high magnification. In the control group, we observed a simple line of MCs expressing cytokeratin. The only  $\alpha$ SMA-positive cells were observed in smooth muscle around the blood vessels located deep between muscles (Figure 3, left

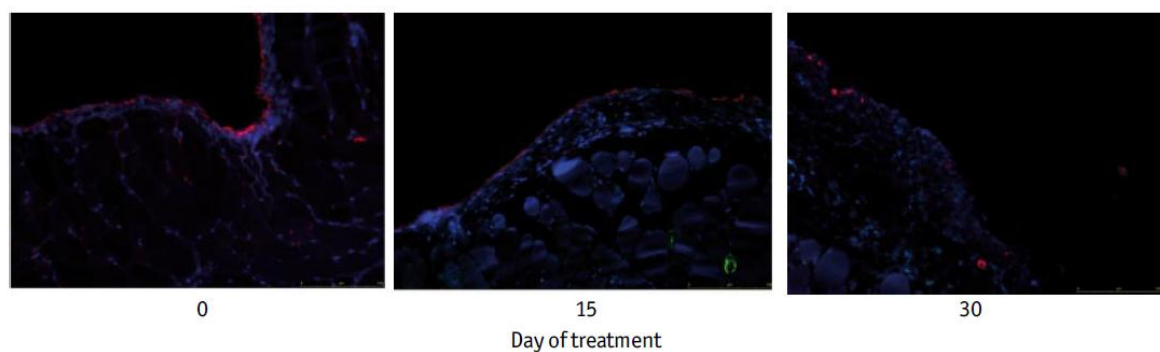


Figure 2 — Immunofluorescence detection of mesothelial cell markers (green:  $\alpha$ SMA; red: cytokeratin; blue: DAPI) at different times in a chronic mouse model of peritoneal dialysis fluid exposure demonstrates a time-dependent loss of cytokeratin by mesothelial cells and submesothelial location of mesothelial cells.

panels). In PM of mice exposed to dialysis solution, we observed loss of cytokeratin-positive cells in the mesothelium. The presence of cells expressing both cytokeratin and  $\alpha$ SMA in the submesothelial space (Figure 3, white arrows, upper and lower right panels) indicates that at least some of the myofibroblasts involved in peritoneal damage originated from MC conversion in the peritoneum of mice exposed to PDF (Figure 3, right panels).

## DISCUSSION

Compromise of PM due to exposure to dialysis solution is a serious event in PD because the treatment is based on the functional integrity of the PM (6). In order to better develop efficient therapies to prevent or treat compromised PM, it is necessary to know the intimate mechanisms involved in its deterioration. The study of human peritoneal biopsies permits only a snapshot of a long and complex process that culminates with peritoneal deterioration. Therefore, the development of ani-

mal models of PD is important in improving knowledge of the mechanisms responsible for peritoneal deterioration and in testing potential counteractions.

We recently described a mouse model of chronic exposure to dialysis fluid in which 5 weeks of treatment caused morphological and functional changes similar to those observed in patients (unpublished observations). Exposure to standard high glucose dialysis solution induced thickening of PM due to the deposition of extracellular matrix. In addition, the treatment also induced angiogenesis that culminated with a lesion similar to that in humans and associated with loss of dialytic capacity of the PM.

One of the important events involved in peritoneal deterioration is myofibroblast conversion of MCs (3). Evidence suggests that these cells play an important role in the deposition of extracellular matrix and the angiogenesis that compromise the PM of PD patients (4). Here, we addressed the effect of chronic exposure to a conventional high glucose dialysis solution on the progression of PM damage. The results demonstrate that

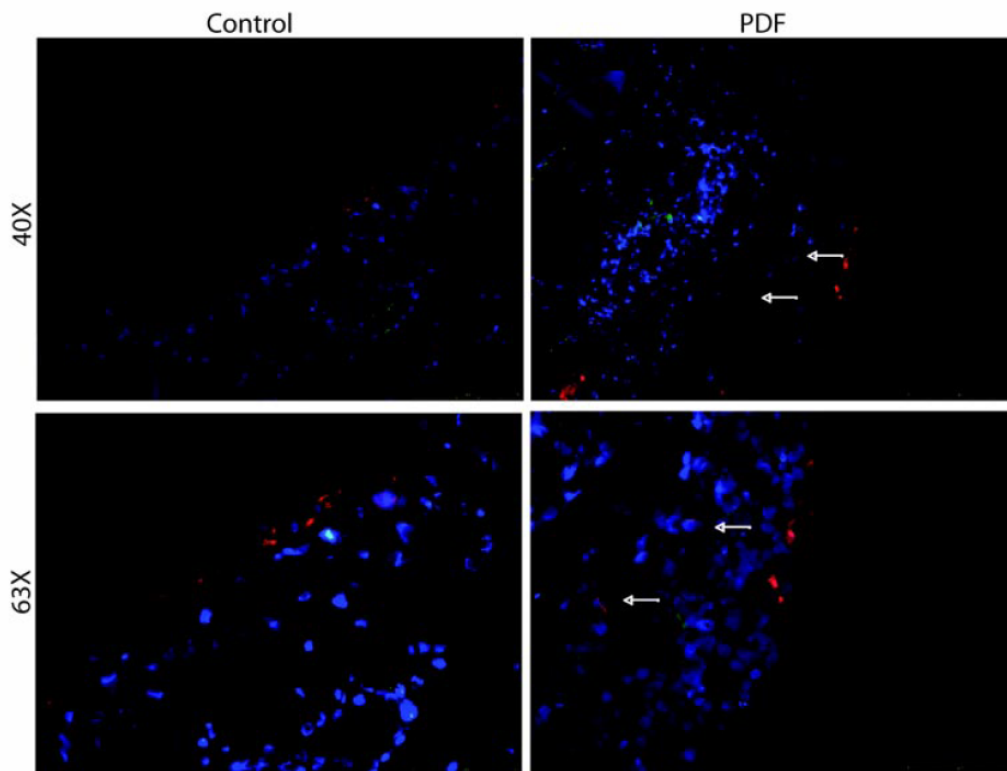


Figure 3 — Mesothelial cells at the submesothelial space express alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA). Images of peritoneal biopsies of mice at day 0 (control; left panels) and after 30 days of treatment with peritoneal dialysis fluid (PDF; right panels) were analyzed at  $\times 40$  (upper panels) and  $\times 63$  (lower panels). The presence of cells expressing both cytokeratin and  $\alpha$ SMA at the submesothelial space in PDF-treated mice are shown (white arrows).



peritoneal thickness increases progressively with time of treatment (Figure 1). We also observed that mesothelium denudates while treatment is maintained (Figure 2). In addition, we observed the presence of cytokeratin- and  $\alpha$ SMA-positive cells at the submesothelial space, suggesting that EMT of MCs also takes place in our model of chronic exposure to conventional dialysis solution.

The results presented in this work suggest that EMT of MCs also contributes to the progression of peritoneal deterioration in a mouse model. We do not yet know how important this process is in the onset of peritoneal deterioration or the initial mechanisms responsible for MC conversion. However, the mouse model may contribute to answering these questions through the utilization of genetically modified mice.

#### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2007-61201 and PET2006-0256 (from Ministerio de Educación y Ciencia) to M. López-Cabrera and FIS PI06/0098 and RETICS 06/0016 (from Fondo Investigaciones Sanitarias) to R. Selgas. This work was also partially supported by Fresenius Medical Care and Gambro Europe. L.S. Aroeira was supported by RETICS 06/0016. G.T. González-Mateo received financial support from Gambro Europe.

We thank Javier Benito de la Víbora (DVM) and Carlota Largo Aramburu (DVM, PhD) for their assistance with care of the mice.

#### REFERENCES

1. Aroeira LS, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, *et al.* Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:2004-13.
2. Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 2003; 348:403-13.
3. Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, *et al.* Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 2004; 444:247-56.
4. Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, Cirugeda A, *et al.* Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* 2005; 46: 938-48.
5. Del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, Bajo MA, Aroeira LS, Aguilera A, Fernandez-Perpen A, *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells is an early event during peritoneal dialysis and is associated with high peritoneal transport. *Kidney Int Suppl* 2008; 108:S26-33.
6. Krediet RT. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 1999; 55:341-56.

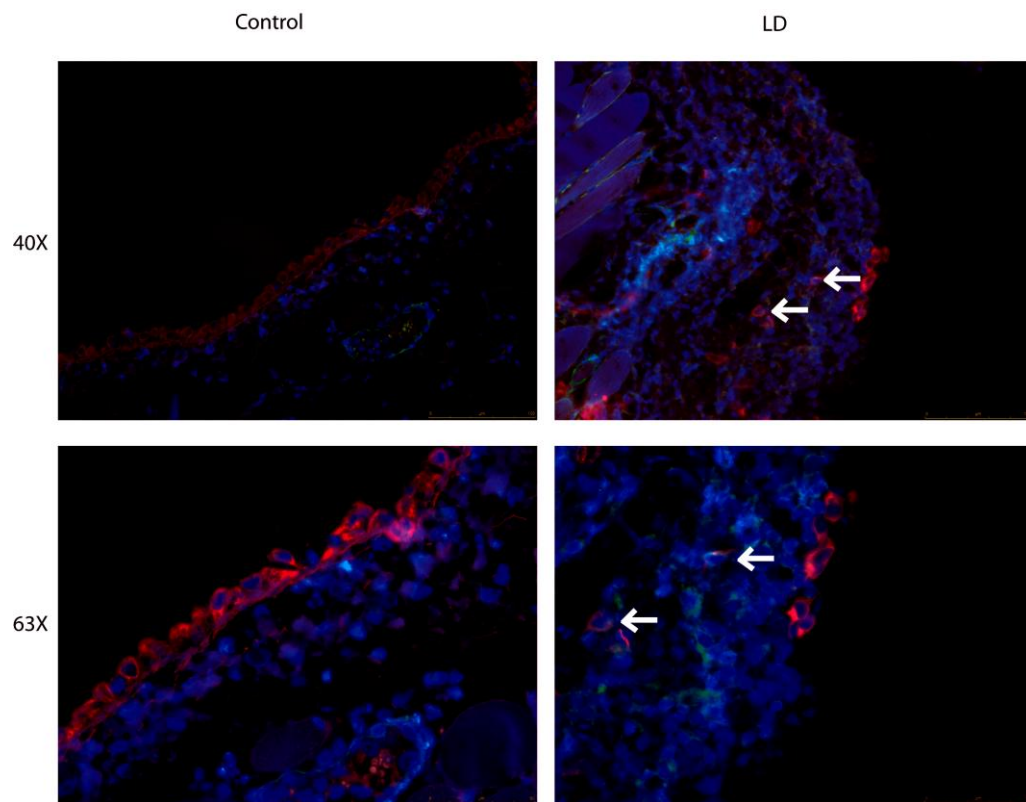


Figure 3

## IV.2.- Caracterización de la progresión de la inflamación causada por la exposición del peritoneo al líquido de diálisis

### • IV.2.1.- La exposición a LD da lugar a una inflamación peritoneal crónica

Estudios previos con muestras humanas sugieren la existencia de cambios tanto en poblaciones de células como en concentraciones de moléculas inflamatorias en el peritoneo durante tratamientos de DP<sup>38,44,49-51,58</sup>. Tras haber descrito en el modelo animal que la instilación de LD provoca un incremento de la celularidad en la MP, decidimos comprobar si esto está relacionado con la existencia de una inflamación crónica a nivel local. Analizamos también si esta inflamación crónica está implicada en el deterioro del peritoneo.

Para ello, se analizan las células presentes en la MP y las drenadas en lavados peritoneales a distintos tiempos de tratamiento con LD, y se relaciona su cinética de aparición con la progresión de las lesiones peritoneales. Asimismo, se estudian las citoquinas y quimioquinas secretadas al espacio peritoneal. Por otra parte, se analiza también la influencia de un catéter permanente debido a la controversia actual sobre la importancia de su utilización en estos estudios y su interferencia con los resultados<sup>130-131</sup>. Los resultados muestran que la mayoría de nuevas células que aparecen en la MP son CD45<sup>+</sup>/FSP1<sup>+</sup>, células hematopoyéticas que expresan un marcador de células fibroblastoides, lo que sugiere que pudiera tratarse de fibrocitos, que contribuirán a la fibrosis. Además aumenta la celularidad en lavados peritoneales con el tiempo de tratamiento, correlacionando con el engrosamiento de la MP. Así, se observa aumento de macrófagos y linfocitos T, y disminución de linfocitos B. Por otro lado, existe un aumento con el tiempo de las quimioquinas MCP-1, MCP-3, RANTES Y MIP-1 $\beta$ ; y de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Por su parte, MIP1- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  aumentan a 15 días de tratamiento pero no a 30. Los altos niveles de quimioquinas explican el incremento de células inflamatorias en los lavados peritoneales. No hay un patrón predominante de respuesta de células T, ya que aumentan citoquinas típicas de células Th1 o Th2, así como de T reguladoras y Th17. La reacción que se produce frente a la presencia del catéter queda muy focalizada en la zona de inserción del mismo, sin afectar al estado global del peritoneo.

Estos datos revelan alteraciones en las poblaciones de células inflamatorias de la cavidad peritoneal que correlacionan con la fibrosis. La presencia de LD puede favorecer la aparición de fibrocitos que colaboren en la aparición de fibrosis.

➤ *IV.2.1.1. Caracterización de la inflamación inducida por Líquido de Diálisis*

**Characterization of peritoneal dialysis fluid induced inflammation**

Guadalupe Tirma González-Mateo<sup>1</sup>, Vanessa Fernández-Millara<sup>1</sup>, Manuel López-Cabrera<sup>3</sup>, Rafael Selgas<sup>1,2</sup>, Luiz Stark Aroeira<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Investigación Hospital Universitario la Paz, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Servicio de Nefrología, Instituto de Investigación Hospital Universitario la Paz, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid, Spain.

Running title: PDF-induced inflammation

Abstract: 142 words

Text: 1385 words

Corresponding Authors:

Luiz Stark Aroeira

lstark.hlpr@salud.madrid.org

Instituto de Investigación Hospital Universitario la Paz

Paseo de la Castellana, 261,

Madrid, 28046, Spain

Fax: +34 917277524

Phone: +34 91 7277221

**Abstract**

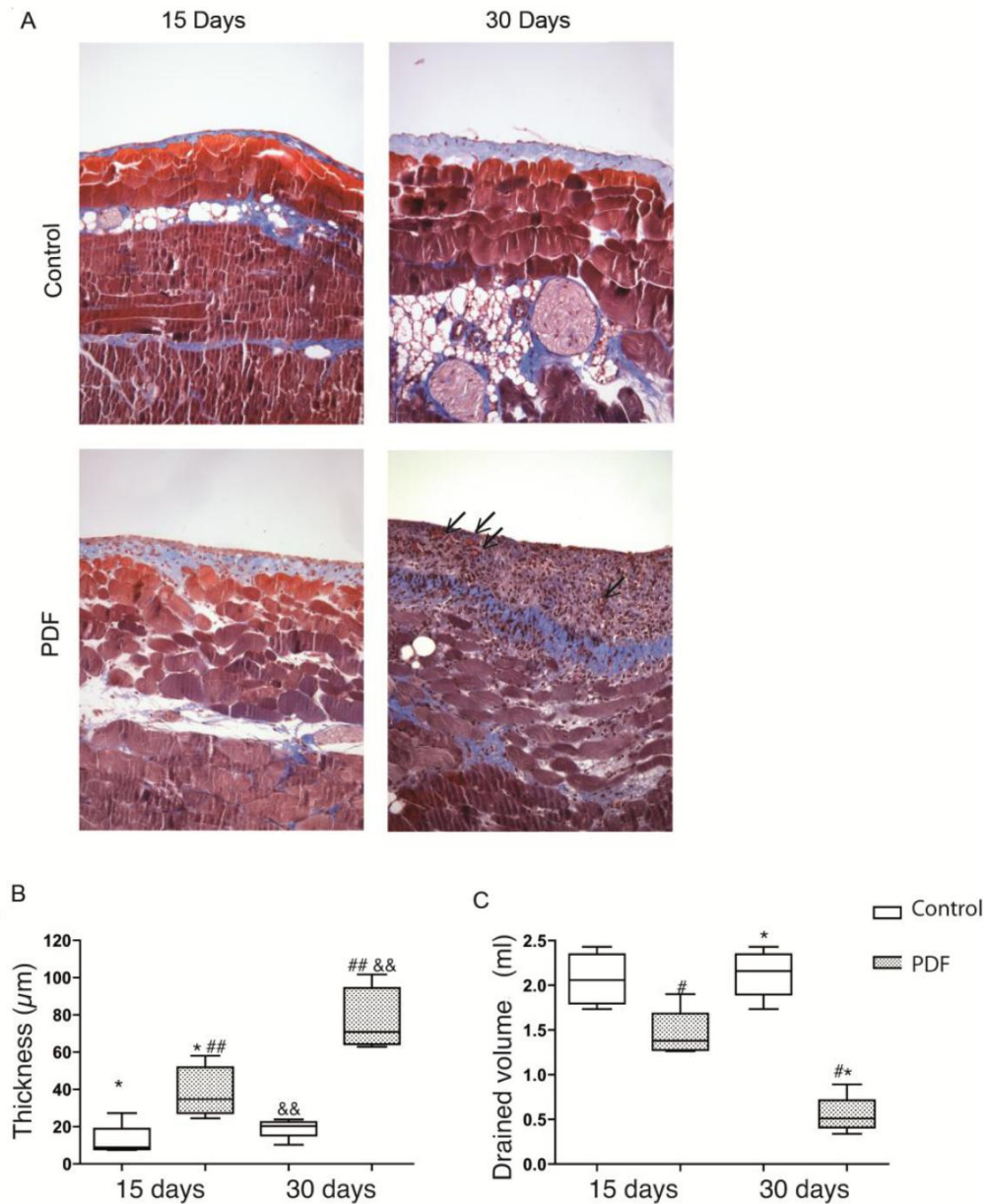
Inflammation has been related to fibrosis in different pathologies. The characterization and the role of inflammation in peritoneal dialysis-induced fibrosis are still poorly understood. In this manuscript, we characterized the inflammation induced by chronic exposure to peritoneal dialysis fluid (PDF) and its relation with peritoneal fibrosis. The results clearly demonstrate that PDF induce peritoneal inflammation, characterized by increased number of inflammatory cells, chemokines and cytokines. This inflammation is related with fibrosis as we found inflammatory cells showing fibroblastic markers at the peritoneal membrane. Control group, with indwelling catheter that received no liquid instillation, presented a foreign body inflammatory reaction and fibrosis restricted to catheter area. This is the first comprehensively analysis of PDF-induced peritoneal inflammation and fibrosis. The results reveal very complex phenomena with no predominance of T cell response and with the involvement of different cellular and molecular elements. Future experiments are necessary to evaluate the relevance of these elements in the development and progression of peritoneal damage.

Peritoneal dialysis (PD) is a renal replacement therapy for patients with end-stage renal disease. It uses peritoneal membrane as a semi-permeable membrane that is exposed to glucose-based hypertonic solutions. Peritoneal membrane consists on a mesothelial monolayer laying on submesothelial connective tissue. When chronically exposed to PD-fluid (PDF), peritoneum suffers structural and functional changes that ultimate with peritoneal sclerosis and ultrafiltration failure, compromising the treatment efficacy and patient outcomes<sup>1</sup>. The morphological changes include mesothelial cell denudation, fibrosis and neovascularization<sup>1</sup>. The mechanisms underlying these alterations are still poorly understood. Some evidences suggest that chronic renal disease is able to induce peritoneal membrane (PM) alterations *per se*<sup>2</sup>. However, PDFs are the main responsible of peritoneal deterioration<sup>3</sup>, mainly their glucose<sup>4</sup>.

Peritoneal inflammation appears to play an important role in the peritoneal deterioration<sup>5</sup>. Mesothelial cells are the first line of contact between PDF and the body. The glucose and its degradation products (GDP) play an important role in stimulating mesothelial cells to trigger a peritoneal inflammatory process. The exposure to GDP, Amadori's adducts and advanced glycation end products (AGES) stimulate NF- $\kappa$ B and the secretion of different cytokines and chemokines *in vitro*<sup>6-7</sup>. In PD patients, there is an increased serum concentration of IL-6, TNF- $\alpha$ , VEGF and C-reactive protein that suggest an increased systemic inflammation<sup>5,8-9</sup>. However, it is still not clear what happens at peritoneal cavity exposed to PDF. It is a consequence of the difficulty to address this point in patients. Here, we analyze the morphological and functional effects of peritoneum exposition to PDF at different time-points in a mouse model with indwelling catheter, in the context of peritoneal inflammation.

For this purpose, we used two experimental groups: one with the catheter that receive no fluid instillation, called Control, and another one that received a daily instillation of 2ml of commercial PDF with glucose 4,25% (StaySafe 4,25%, Fresenius Medical Care, Germany), called PDF. We analyze the differences between both groups at 15 and 30 days of exposition. In the Figure 1A, we show the Masson's trichrome staining of peritoneal biopsies of Control and PDF groups at day 15 and 30 of treatment. At control group, we observed no difference between days 15 and 30. The PDF group presented more matrix deposition and cellularity at PM than control group in both time-points analyzed. In addition, peritoneal fibrosis and inflammation were bigger at day 30 than at day 15 in PDF group. Morphometric study demonstrated that PDF exposition induces PM thickening (Figure 1B).





*Figure 1. Peritoneal dialysis fluid-induced peritoneal membrane deterioration.* In A, a representative peritoneal membrane biopsy of Control and PDF group obtained at 15 and 30 days of treatment and stained with Masson's trichrome. Blood vessels are present at peritoneal membrane of PDF group at day 30 of treatment (Arrow). Morphometric analysis reveals that PDF exposure, but not catheter, induces peritoneal thickening (B) and drained volumes after 40 minutes of exposition to PDF (C). Experiment was repeated and present similar result. Box plots represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles and median, minimum, and maximum values.  $n \geq 5$  in each group at each time. Significance was determined using Mann-Whitney test. \* and #  $p < 0.05$ ; ## and &&  $p < 0.01$

The absence of inflammation and fibrosis observed in the control group contrasts with recently published data in which indwelling catheter *per se* cause a huge peritoneal inflammation and fibrosis<sup>10</sup>. The differences between these results may be a consequence of

different procedures. Here, we installed the catheter at the upper right quadrant of the abdomen and biopsies were taken from the contra-lateral zone (left flank). We analyzed the effect of catheter on the peritoneal membrane of control mice. Catheter induces a foreign body reaction characterized by peritoneal inflammation and fibrosis near the catheter; however, farther from the catheter, PM gets thinner (Supplementary Figure s1-A) and, at contra-lateral peritoneum, the peritoneal biopsy was similar to that observed in un-manipulated mice (Supplementary Figure s1-C). In Supplementary Figure s1-B, we show details in higher magnification of catheter-induced inflammation and fibrosis at three different points of the membrane. Therefore, any thickening at contra-lateral peritoneal membrane of PDF-treated animals is a consequence of treatment. On the contrary, if the biopsy is obtained near the catheter, an inflammation caused by a foreign body reaction could interfere with the analysis. Moreover, the fact of using a catheter to administer the PDF is interesting since it better resembles the methods used in PD patients.

PDF mice at day 30 also presented increased number of blood vessels at PM (Figure 1A, arrow), but not control mice (Figure 1C). It increases the area of interchanges, leading to ultrafiltration deficiency. Together, these results demonstrate that peritoneal exposure to PDF, but not the simple presence of the catheter, induces peritoneal damage.

Inflammation is considered a key event in fibrosis development<sup>11</sup>. At peritoneal cavity, mesothelial cells, adipocytes and inflammatory cells will produce cytokines and chemokines that sustain and improve inflammation<sup>6-7,12-13</sup>. In PD-patients, inflammation was demonstrated by an increase in serum level of IL-6, TNF- $\alpha$  and CRP<sup>8,14-15</sup>. At peritoneal level, little is known about PDF-induced inflammation in patients<sup>16</sup>. However, in infectious peritonitis, it was demonstrated an increased peritoneal level of INF- $\gamma$ , IL-12 and IL-18<sup>17</sup>. The dilution of inflammatory peritoneal cells and molecules by the continuous PD fluid substitution impaired the determination of inflammation role at peritoneal deterioration. In animal model, where the PDF is not drained periodically, the cells, cytokines and chemokines are concentrated at peritoneal cavity, accelerating the process of peritoneal fibrosis. It also permits their identification.

Therefore, we performed an analysis of cellular and molecular elements at peritoneal washes of PDF and Control groups. As shown in Figure 2A, PDF exposure induces an increase number of cells at peritoneal cavity compared with control mice. This increased number of cells strongly correlates with peritoneal thickening (Figure 2B). Indeed, we found inflammatory cells (CD45<sup>+</sup>) attached to the PM, expressing FSP-1, a fibroblastic marker (Figure 3). Given their fibroblastic characteristics, these cells may collaborate in the generation of extracellular



matrix. The number of macrophages (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>) (Figure 2C), CD4<sup>+</sup> T cells (Figure 2E) and CD8<sup>+</sup> T cells (Figure 2F) drained at peritoneal washes were higher in PDF than in Control group. Moreover, macrophages are the most predominant inflammatory population. However, CD19<sup>+</sup> B cells tend to be lower in PDF compared to control group. These results demonstrate that PDF exposure induces an inflammatory process at peritoneal cavity, and that it correlates with peritoneal fibrosis.

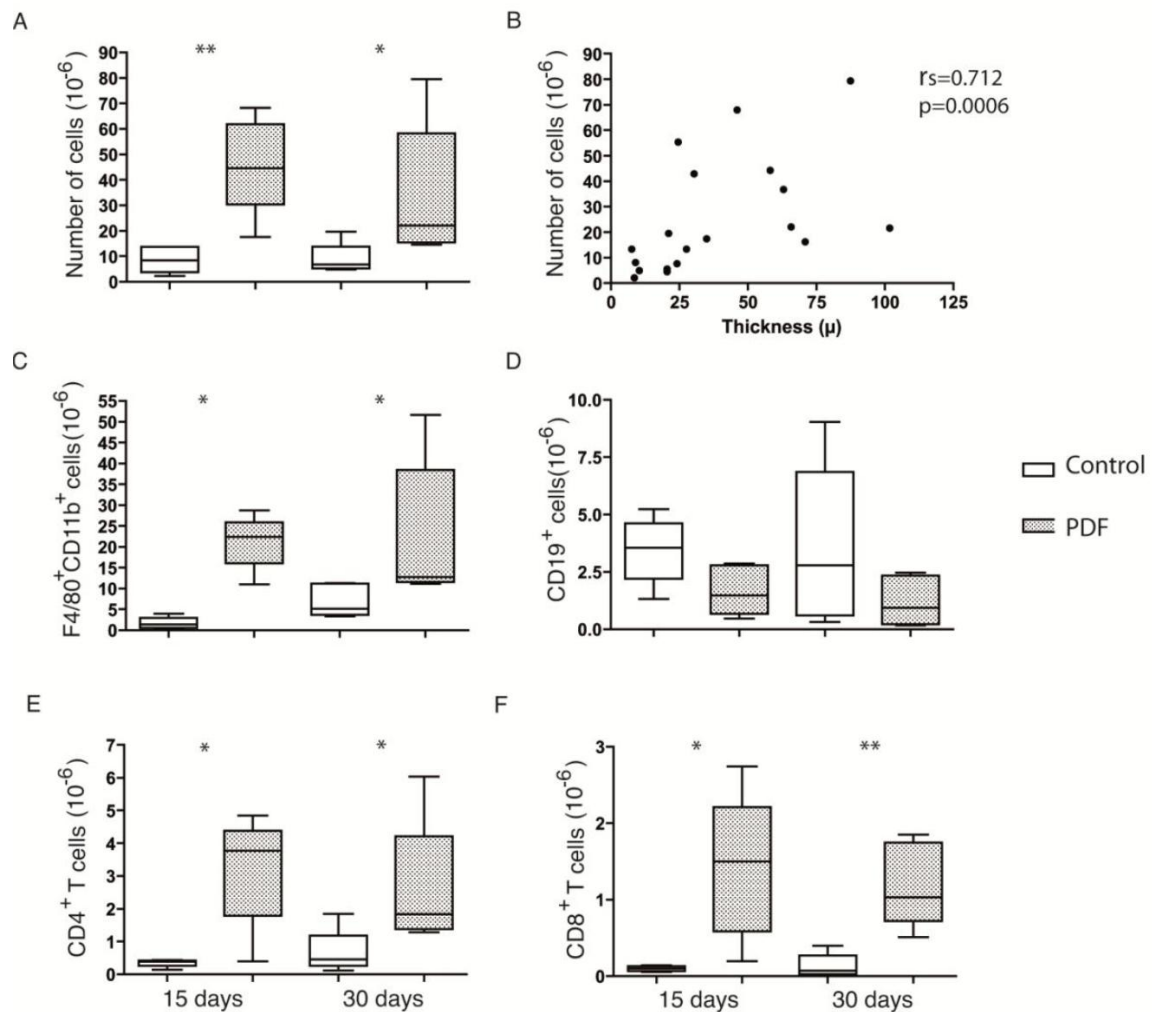
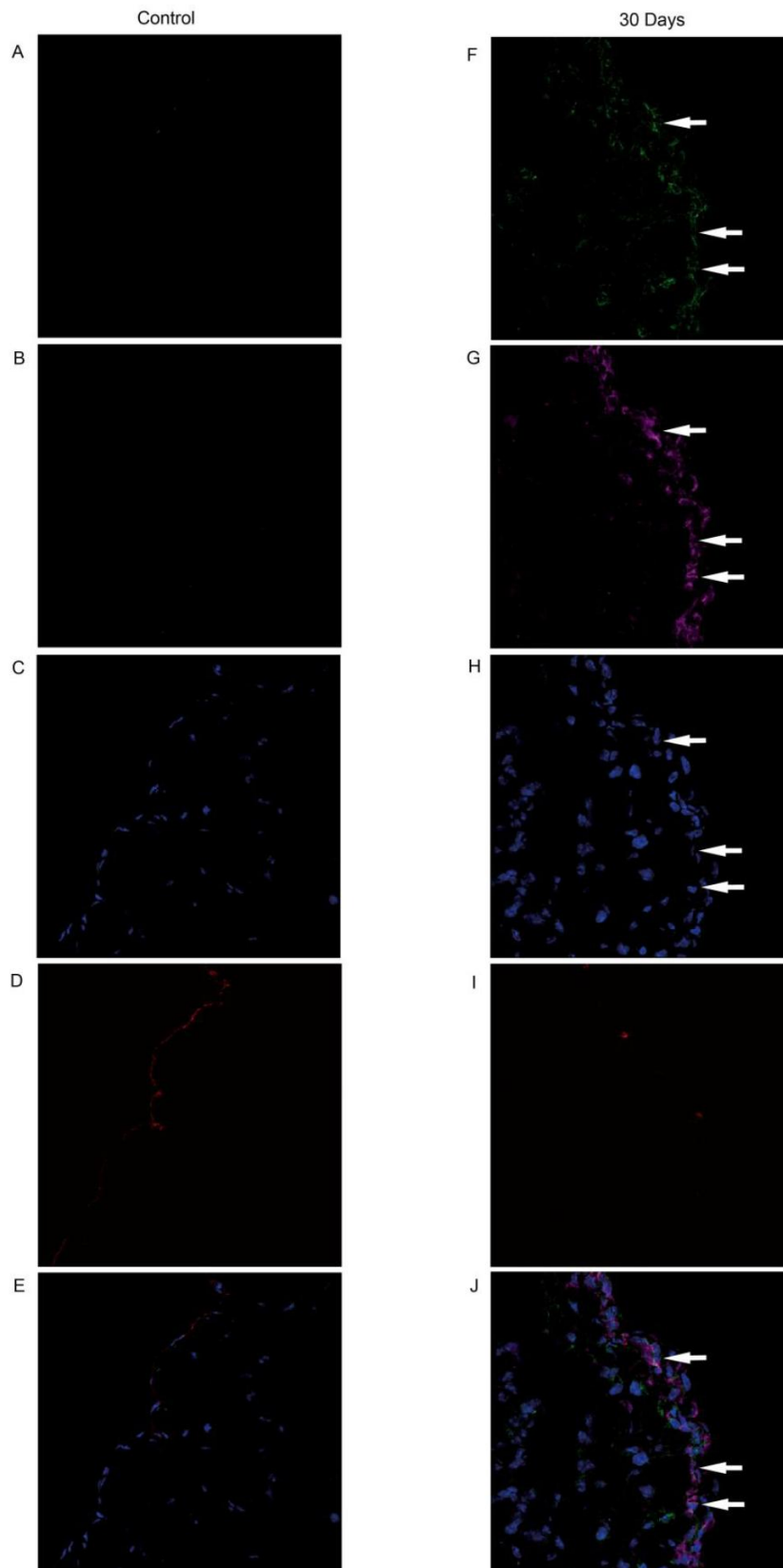


Figure 2. Peritoneal dialysis fluid does induce peritoneal inflammation. The exposure to PDF induces an increased number of cells at peritoneal cavity (A). The increasing number of cells is strongly correlated with peritoneal thickening and fibrosis (B). Macrophages (C), CD4<sup>+</sup> (E) and CD8<sup>+</sup> (F) T cells are present in higher number at peritoneal cavity of mice exposed to PDF than control group. The number of B cells remain does not modified significantly by the exposure to PDF. Experiment was repeated and present similar result. Box plots represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles and median, minimum, and maximum values.  $n \geq 5$  in each group at each time. Significance was determined using Mann-Whitney test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$



*Figure 3.* Immunofluorescence staining of Peritoneal membranes of a control and a PDF mice. The figure shows CD45 (green), FSP-1 (purple), DAPI (blue) and cytokeratin (red) staining. A to E correspond to control mouse. F to I correspond to PDF mouse. (E and J) Merges.

Chemokines play an important role in immunological cell migration and activation. At PDF group, the peritoneal levels of chemokines MCP-1 (Figure 4A), MCP-3 (Figure 4B), RANTES (Figure 4C) and MIP-1 $\beta$  (Figure 4D) were higher than control group at both times. The concentration of MIP-1 $\alpha$  was higher in PDF group than in control at day 15, but not at day 30. The elevated level of chemokines explains the elevated number of inflammatory cells at peritoneal cavity of PDF-treated mice. MCP-1 and MCP-3 and MIP-1 are the main chemokines involved in macrophages recruitment<sup>18</sup>, while RANTES is involved on T cells migration. Both types of cells improve their peritoneal number significantly upon PDF exposure.

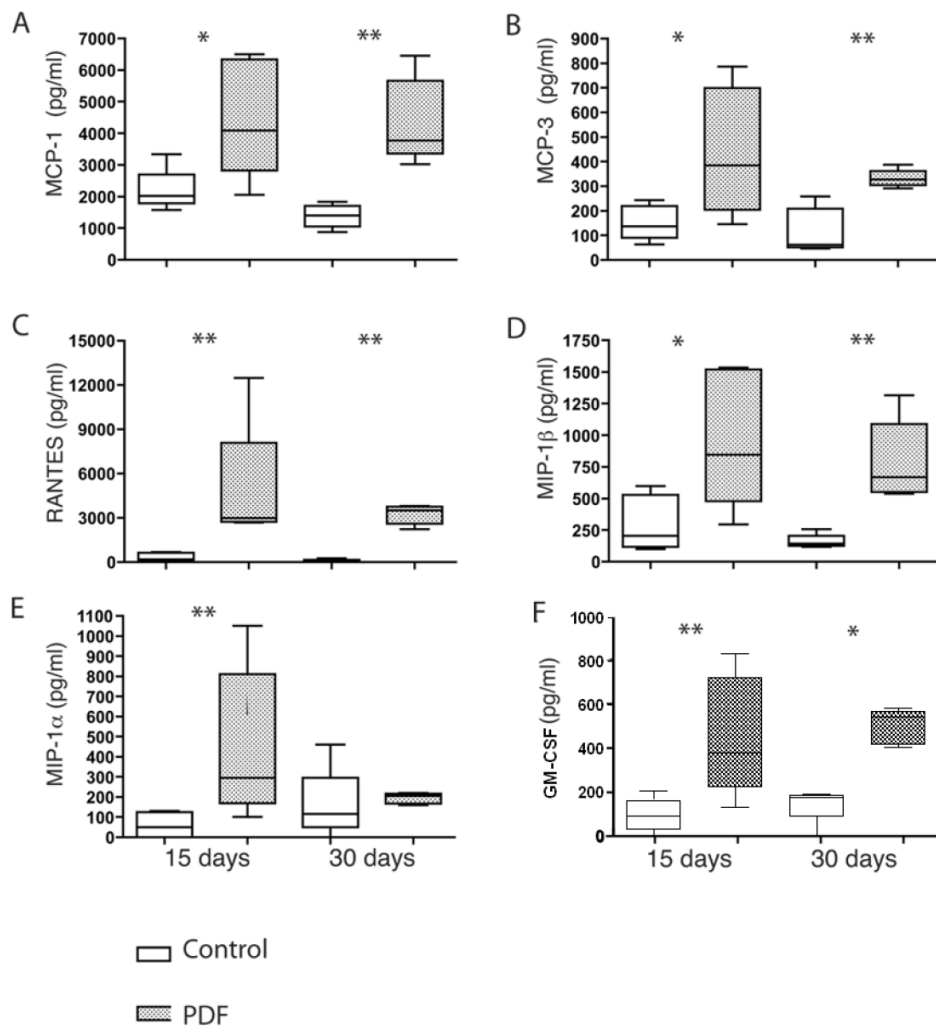


Figure 4. The levels of chemokines at peritoneal cavity are elevated in response to peritoneal dialysis fluid exposure. The levels of MCP-1 (A), MCP-3 (B), RANTES (C), Mip-1b (D) and Mip-1a (E) are elevated, at least in one time point, at peritoneal cavity of mice exposed to PDF compared to control group. Experiment was repeated and present similar result. Box plots represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles and median, minimum, and maximum values.  $n \geq 5$  in each group at each time. Significance was determined using Mann-Whitney test. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

As shown at Figure 5A, IL-1 $\beta$  level was higher in PDF than in Control group at day 15, but at day 30 both groups presented the same level. The level of IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  was higher in PDF group than in Control group at both time points (Figure 5 B-I, respectively).

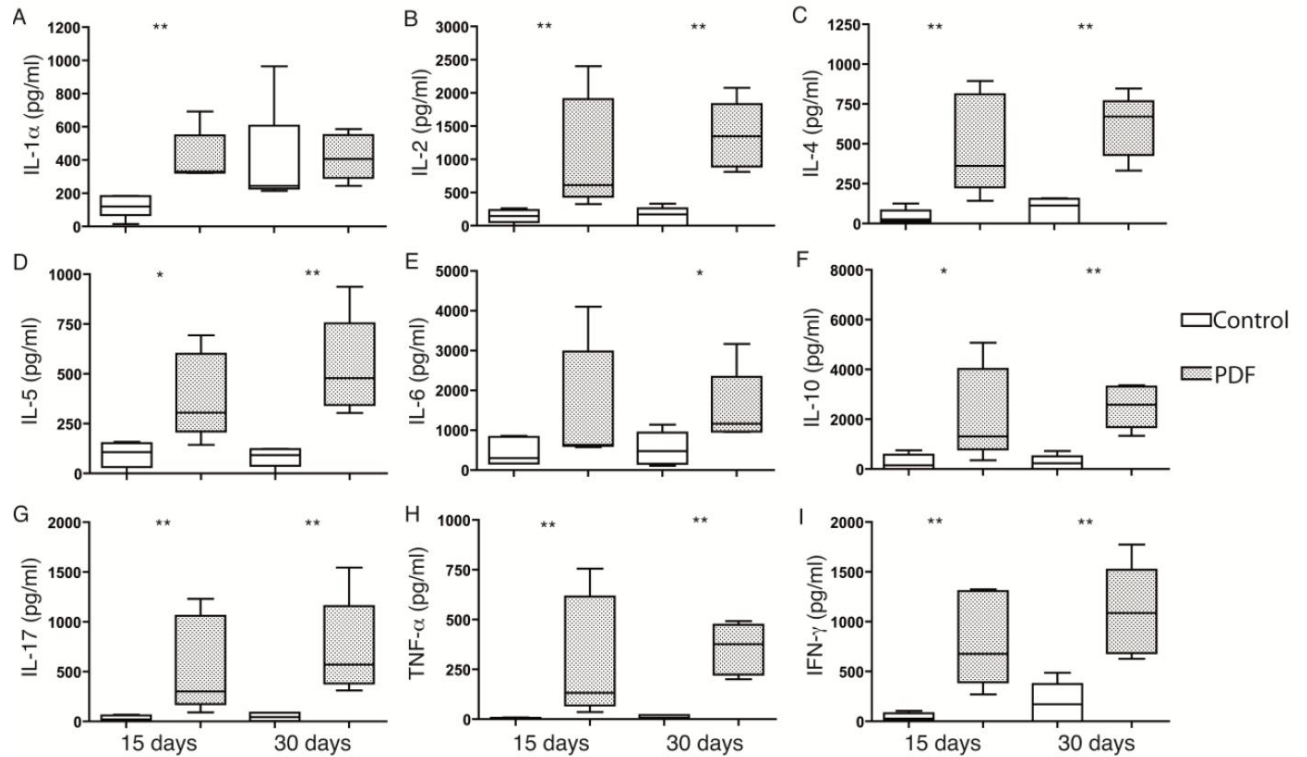


Figure 5. Peritoneal dialysis fluid induces cytokine production without any predominant pattern of T response. The levels of cytokines related to Th1 [IL-1 $\alpha$  (A), IL-2 (B), IL-6(E) TNF- $\alpha$  (H) and IFN- $\gamma$  (I)], Th2 [IL-4 (C) and IL-5 (D)], Th-17 (G) as well as T reg [IL-10 (F)] response are higher in mice exposed to PDF compared to control group. Experiment was repeated and present similar result. Box plots represent 25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles and median, minimum, and maximum values. n $\geq$  5 in each group at each time. Significance was determined using Mann-Whitney test. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

Cytokines play a key role in immunological and inflammatory phenomena and has also been related with fibrosis<sup>19</sup>. In general it is assumed that a specific pattern of cytokines should be produced during an immunological event. Different studies addressed the cytokines pattern produced at peritoneal cavity of patients under PD treatment<sup>20-22</sup>. However, the results are still not clear. The analysis of cells expressing intracellular cytokines suggests that a Th2 type response predominates at a peritoneal cavity of patients on PD<sup>20-21</sup>. However, *ex vivo* polyclonal stimulation of purified peritoneal T cells generate a Th1 type cytokine response<sup>22</sup>. The discrepancy in these results could be explained by experimental approaches used. In our model there was no predominant type of T cell response. In fact, at drained liquid we observed Th1 (IL-2 and INF- $\gamma$ ), Th2 (IL-4 and IL-5), Treg (IL-10) and the recently described Th17 (IL-17) pattern of response , occurring simultaneously.

Cytokines play an important role in fibrosis. It could acts directly, promoting fibroblast activation, or indirectly through activation or regulation of mechanisms that may induce proliferation and activation of fibroblasts. Every type of T cells response appears to be potentially fibrogenic, depending on the model. Th1 has been related with peritoneal fibrotic adhesion<sup>23</sup>; Th2 response has been related with fibrosis in lung<sup>24</sup> and schistosome infection<sup>25</sup>; Th17 has been related to heart fibrosis<sup>26</sup>. Recently, the regulatory effect of IL-10 was related to silica-induced lung fibrosis<sup>27</sup>. These results suggest that those cytokines could play a role in PDF-induced peritoneal fibrosis in our model of PD. Taken together, the results presented here clearly demonstrate that PDF induced a peritoneal inflammation that correlates with the fibrosis of peritoneal wall. The inflammatory process involved the migration of T cells and macrophages into peritoneal cavity droved by chemokine production. These cells are attaching the PM and acquiring fibroblastic characteristics, thought contributing to peritoneal thickening. These results suggest that fibrocytes can play a role during fibrogenesis in PM. In addition, an increased concentration of potentially fibrogenic cytokines accumulates in peritoneal cavity.

This is the first time a comprehensively analysis of PDF-induced peritoneal inflammation has been performed and the results demonstrated a very complex phenomena with the involvement of different cellular and molecular elements. For the future, more experiments should be performed in order to evaluate the relevance of these elements in the development and progression of peritoneal damage. These results may contribute in the development of new approaches to retard or treat PDF-induced peritoneal fibrosis.

## **Concise methods**

### *Animals and surgery*

Female C57BL/6 mice were bought from Charles River Laboratories (France) and maintained in conventional conditions in our animal facilities (Experimental Surgery Department, Research Unit, Hospital La Paz). The catheter implantation was performed as previously described<sup>28</sup>. The experimental procedure was performed according to NIH guide for the care and use of laboratory animals and was approved by Institutional ethical committee.

### *Histological analyses.*

Parietal peritoneum biopsies were fixed in Bouin solution, embedded in paraffin, cutted into 5  $\mu$ m sections and stained with Masson's trichrome. Peritoneal membrane thickness was



determined at microscope (*Leica CTR6000, with a Leica Microsystems LAS-AF6000*).

#### *Drained volume test*

The last day of treatment, mice received 2 mL of PDF and were sacrificed 40 minutes later. The total peritoneal volume was collected and weighted.

#### *Flow Cytometry analyses*

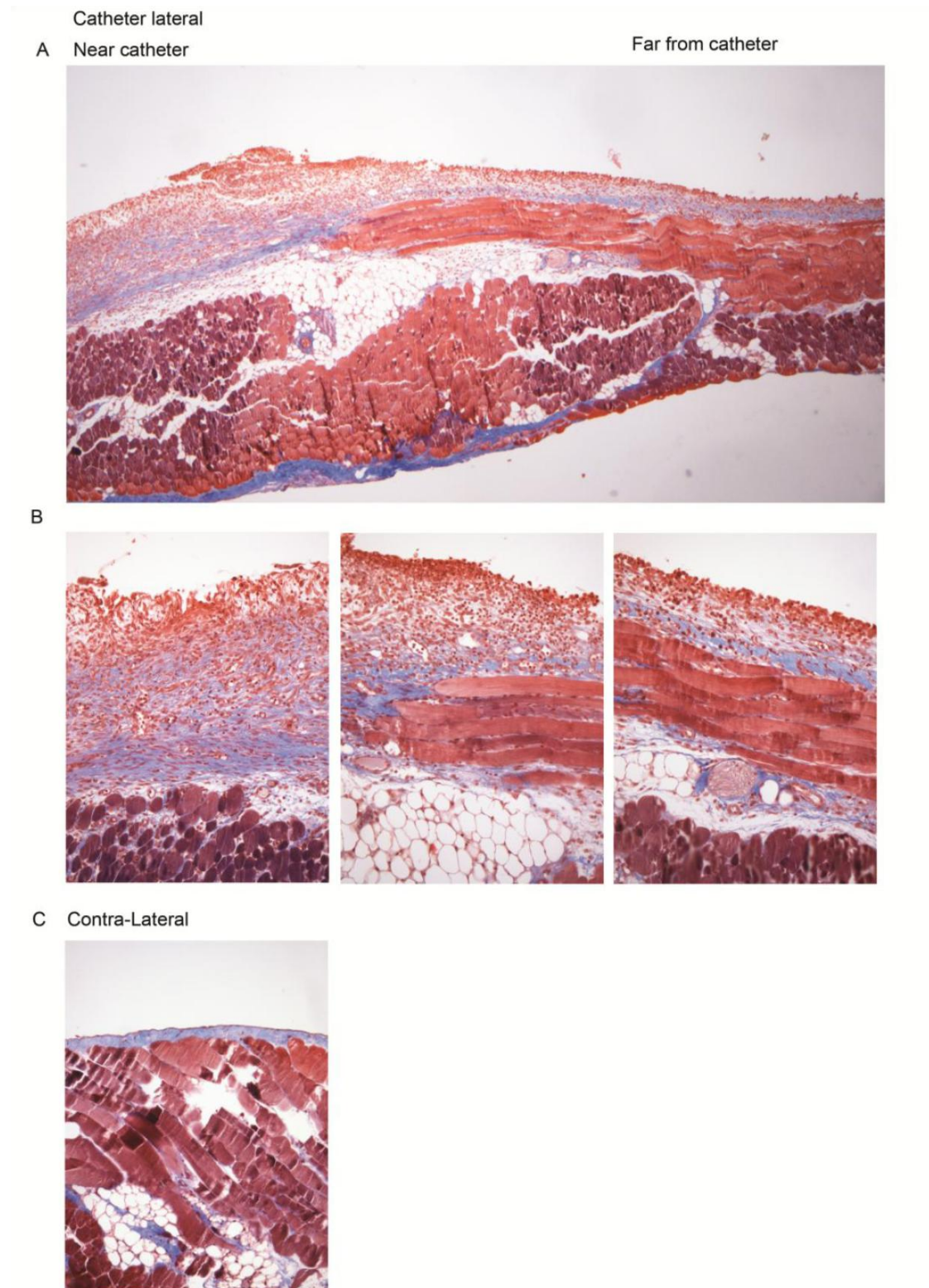
The following antibodies used for flow cytometry analyses were purchased from BD Biosciences: PE anti mouse CD11b, APC rat anti- mouse Gr-1, PE anti-mouse CD4, biotin anti-mouse CD3e, FITC rat anti-mouse CD25, FITC rat anti-mouse CD19 and Alexa Fluor 488 labeled anti-mouse CD8a. PE-Cy7 conjugated anti-mouse F4/80 (Clone BM8) was purchased from eBioscience (San Diego, USA). Flow cytometry analyses were conducted on a FACSCalibur (BD Biosciences) with Cell Quest Pro software.

#### *Chemokines and cytokines assays*

For determination of peritoneal production of cytokines and chemokines, peritoneal cavity was washed with two ml of saline immediately after mice sacrifice, centrifuged and supernatant separated in small aliquots and stored at -80°C. The peritoneal chemokines and cytokines were determined using flowcytomix technique (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

#### *Statistical analyses.*

Data were analyzed with *GraphPad Prism version 4* software for Macintosh. Comparison between two groups was made with nonparametric Mann-Whitney *U* test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. All the experiments were repeated at least two times.



*Figure 1 Supplementary. Indwelling catheter does induce a restricted foreign body inflammatory reaction and fibrosis. Catheter lateral (A and B) and contra-lateral (C) biopsy of parietal peritoneal membrane from control group stained with Masson's trichrome. The foreign body inflammatory reaction observed near the catheter gradually decreases as the distance from it (A). The areas delimited by the black square are shown in higher magnification in (B). Biopsy of contra-lateral parietal membrane of the same animal did not show any signal of inflammation or fibrosis (C). The result is representative of five animals.*

### **Acknowledgments**

We thank Carlota Largo Aramburu DVM, PhD for assistance with mice. This work was supported by RETICS 06/0016 (LA, VFM, RS) and FIS PI 09/0064(RS) from Fondo Investigaciones Sanitarias and, from SAF 2010-21249 and SAF SAF2007-61201 (MLC) from Ministerio de Ciencia e Innovación.

### **Disclosures**

Authors declare no financial conflict of interest.

## Bibliography

1. Krediet, R.T., Zweers, M.M., van der Wal, A.C. & Struijk, D.G. Neoangiogenesis in the peritoneal membrane. *Perit Dial Int* **20 Suppl 2**, S19-25 (2000).
2. Honda, K., *et al.* Impact of uremia, diabetes, and peritoneal dialysis itself on the pathogenesis of peritoneal sclerosis: a quantitative study of peritoneal membrane morphology. *Clin J Am Soc Nephrol* **3**, 720-728 (2008).
3. Jiménez-Heffernan, J.A.P., C.; Bajo, M.A.; Picazo, M. L.; Del Peso, G.; Aroeira, L.; Aguilera, A.; Tejerina, E.; López-Cabrera, M.; Selgas, R. Tissue distribution of hyalinizing vasculopathy lesions in peritoneal dialysis patients An autopsy study. *Pathol Res Pract. epub*(2008).
4. Gotloib, L.W., V.; Shostak, A. A short review of experimental peritoneal sclerosis: from mice to men. *Int J Artif Organs* **28**, 97-104 (2005).
5. Pecoits-Filho, R.S., P.; Wang, A. Y.; Heimbürger, O.; Lindholm, B. Chronic inflammation in peritoneal dialysis: the search for the holy grail? *Perit Dial Int* **24**, 327-339 (2004).
6. Inagi, R., *et al.* Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett* **463**, 260-264 (1999).
7. Nevado, J., *et al.* Amadori adducts activate nuclear factor-kappaB-related proinflammatory genes in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Br J Pharmacol* **146**, 268-279 (2005).
8. Pecoits-Filho, R., *et al.* Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol Dial Transplant* **17**, 1480-1486 (2002).
9. Zemel, D., *et al.* Relationship of TNF-alpha, interleukin-6, and prostaglandins to peritoneal permeability for macromolecules during longitudinal follow-up of peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* **122**, 686-696 (1993).
10. Flessner, M.F., *et al.* PERITONEAL INFLAMMATION AFTER TWENTY-WEEK EXPOSURE TO DIALYSIS SOLUTION: EFFECT OF SOLUTION VERSUS CATHETER-FOREIGN BODY REACTION. *Perit Dial Int* **30**, 284-293 (2010).
11. Martin, P. & Leibovich, S.J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* **15**, 599-607 (2005).
12. Mortier, S., *et al.* Effects of conventional and new peritoneal dialysis fluids on leukocyte recruitment in the rat peritoneal membrane. *J Am Soc Nephrol* **14**, 1296-1306 (2003).
13. Musi, B., Carlsson, O., Rippe, A., Wieslander, A. & Rippe, B. Effects of acidity, glucose degradation products, and dialysis fluid buffer choice on peritoneal solute and fluid transport in rats. *Perit Dial Int* **18**, 303-310 (1998).
14. Lee, C.-T., *et al.* Proinflammatory Cytokines, Hepatocyte Growth Factor and Adipokines in Peritoneal Dialysis Patients. *Artificial Organs* **34**, E222-E229 (2010).
15. Wang, A.Y.-M., *et al.* Is a Single Time Point C-Reactive Protein Predictive of Outcome in Peritoneal Dialysis Patients? *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 1871-1879 (2003).
16. Pecoits-Filho R, C.M., Stenvinkel P, Lindholm B, Heimbürger O. . Systemic and intraperitoneal interleukin-6 system during the first year of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int. Jan-Feb;26*, 53-63. (2006).
17. Wang, H.H.L., C.Y. Interleukin-12 and -18 Levels in Peritoneal Dialysate Effluent Correlate With the Outcome of Peritonitis in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis: Implications for the Type I/Type II T-Cell Immune Response. *American journal of kidney diseases* **46**, 328-338 (2005).
18. Robben, P.M.L., M.; Kuziel, W.A.; Sibley, L.D. Recruitment of Gr-1+ monocytes is



- essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* **201**, 1761-1769 (2005).
19. Wynn, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**, 199-210 (2008).
20. Zamauskaite, A.Y., M.M.; Madrigal, J.A.; Cohen, S.B. The frequency of Th2 type cells increases with time on peritoneal dialysis in patients with diabetic nephropathy. *Eur Cytokine Netw* **10**, 219-226 (1999).
21. Yokoyama, T.N., K.; Futatsuyama, K.; Hayashi, T.; Honda, K.; Uchida, K.; Kawashima, A.; Yumura, W.; Nihei, H. Identification of T Helper Cell Subsets in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patients. *Nephron* **89**, 215-218 (2001).
22. Roberts, G.W., *et al.* Functional Effector Memory T Cells Enrich the Peritoneal Cavity of Patients Treated with Peritoneal Dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* **20**, 1895-1900 (2009).
23. Tzianabos, A.O., *et al.* Functional Th1 cells are required for surgical adhesion formation in a murine model. *J Immunol* **180**, 6970-6976 (2008).
24. Doucet, C., *et al.* Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. *J Clin Invest* **101**, 2129-2139 (1998).
25. Cheever, A.W., *et al.* The role of cytokines in the pathogenesis of hepatic granulomatous disease in *Schistosoma mansoni* infected mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **87**, 81-85 (1992).
26. Faust, S.M.L., G.; Marini, B. L.; Zou, W.; Gordon, D.; Iwakura, Y.; Laouar, Y.; Bishop, D. K. Role of T Cell TGF $\beta$  Signaling and IL-17 in Allograft Acceptance and Fibrosis Associated with Chronic Rejection. *The Journal of Immunology* **183**, 7297-7306 (2009).
27. Liu, F., *et al.* CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T Cells Depletion May Attenuate the Development of Silica-Induced Lung Fibrosis in Mice. *Plos one* **5**, e15404 (2010).
28. Gonzalez-Mateo, G.T.L., J.; Jimenez-Hefferman, J. A.; Bajo, M. A.; Selgas, R.; Lopez-Cabrera, M.; Aroeira, L. S. Chronic exposure of mouse peritoneum to peritoneal dialysis fluid: structural and functional alterations of the peritoneal membrane. *Perit Dial Int* **29**, 227-230 (2009).



### IV.3.- Analizar el efecto de la modulación de la inflamación en el daño peritoneal. Potencialidad de la inflamación como diana terapéutica.

Tras haber corroborado la hipótesis de que la presencia del LD en la cavidad peritoneal está provocando la aparición de un fenómeno inflamatorio crónico, quisimos verificar si la inflamación es una diana potencial en la búsqueda de una terapia efectiva contra la aparición de las lesiones peritoneales.

- **IV.3.1.- Inhibición de la inflamación: Apartado IV.3.1.1.**

La ciclooxygenasa (COX)-2 es una enzima relacionada con procesos patológicos como respuesta inflamatoria, mitogénesis, angiogénesis y progresión de tumores<sup>7</sup>. Además, media la expresión de TGF- $\beta$ , fibronectina y VEGF en el riñón en un modelo en rata de diabetes e hipertensión<sup>87</sup>. Es sabido que las prostaglandinas (PG), generadas por la COX, se producen localmente en la cavidad peritoneal de pacientes en DP y que su síntesis aumenta durante episodios de peritonitis, lo que genera mayor permeabilidad a macromoléculas<sup>132-133</sup>. Más aún, la PG-E<sub>2</sub> induce proliferación y activación de fibroblastos, que secretan colágeno, favoreciendo la fibrosis<sup>134</sup>. Distintos trabajos relacionan la presencia de glucosa o sus productos de degradación como un estímulo inductor de la expresión de COX-2 y la secreción de PG-E<sub>2</sub> en distintos tipos celulares<sup>86,88</sup>.

En la primera parte de este trabajo se comprueba que las células con fenotipo fibroblastoide extraídas del efluente de pacientes en DP y cultivadas *ex vivo*, expresan mayores niveles de COX-2 que las epitelioideas. Utilizamos un inhibidor específico de COX-2, *Celecoxib*, para averiguar si su efecto antiinflamatorio lograba reducir la formación de fibrosis en el modelo *in vivo*. Se analizó también la capacidad de los GDPs del LD para inducir daños en la MP.

De este modo comprobamos que la administración del inhibidor de COX-2 protege al peritoneo de la formación de fibrosis y de la disminución de la capacidad ultrafiltrante. Además, el número de células presentes en el lavado peritoneal es menor. Por otra parte, la administración de LD bajo en GDPs supone un menor daño al peritoneo, no observándose inducción de EMT ni COX-2. Así, concluimos que los GDPs presentes en los LDs pueden contribuir a la aparición de EMT y a la inducción de COX-2, factores que estarían contribuyendo a la exacerbación del proceso inflamatorio. La inhibición de COX-2 o la prevención de su expresión mediante la utilización de LD más biocompatibles puede mejorar los efectos negativos de estos líquidos sobre la capacidad de UF de la MP, reduciendo la inflamación y la fibrosis.

## IV.3.1.1. COX-2 media las alteraciones de la membrana peritoneal inducidas por LD

## BASIC RESEARCH

www.jasn.org

## Cyclooxygenase-2 Mediates Dialysate-Induced Alterations of the Peritoneal Membrane

Luiz S. Aroeira,<sup>\*†</sup> Enrique Lara-Pezzi,<sup>\*\*‡</sup> Jesús Loureiro,<sup>\*\*‡</sup> Abelardo Aguilera,<sup>\*§</sup> Marta Ramírez-Huesca,<sup>\*\*‡</sup> Guadalupe González-Mateo,<sup>\*†</sup> M. Luisa Pérez-Lozano,<sup>\*\*‡</sup> Patricia Albar-Vizcaíno,<sup>\*\*‡</sup> M-Auxiliadora Bajo,<sup>\*†</sup> Gloria del Peso,<sup>\*†</sup> José Antonio Sánchez-Tomero,<sup>\*§</sup> José Antonio Jiménez-Heffernan,<sup>\*||</sup> Rafael Selgas,<sup>\*†</sup> and Manuel López-Cabrera<sup>\*\*‡||</sup>

<sup>\*</sup>Instituto Reina Sofía de Investigaciones Nefrológicas, <sup>†</sup>Unidad de Investigación and Servicio de Nefrología, Hospital Universitario La Paz, <sup>‡</sup>Unidad de Biología Molecular and <sup>§</sup>Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de la Princesa, <sup>||</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Puerta de Hierro, and <sup>||</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid, Spain

## ABSTRACT

During peritoneal dialysis (PD), exposure of the peritoneal membrane to nonphysiologic solutions causes inflammation, ultimately leading to altered structure and function. Myofibroblasts, one of the cell types that contribute to dysfunction of the peritoneal membrane, can originate from mesothelial cells (MCs) by epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), a process that has been associated with an increased rate of peritoneal transport. Because cyclooxygenase-2 (COX-2) is induced by inflammation, we studied the role of COX-2 in the deterioration of the peritoneal membrane. We observed that nonepithelioid MCs found in peritoneal effluent expressed higher levels of COX-2 than epithelioid MCs. The mass transfer coefficient for creatinine correlated with MC phenotype and with COX-2 levels. Although COX-2 was upregulated during EMT of MCs *in vitro*, COX-2 inhibition did not prevent EMT. In a mouse model of PD, however, COX-2 inhibition with Celecoxib resulted in reduced fibrosis and in partial recovery of ultrafiltration, outcomes that were associated with a reduction of inflammatory cells. Furthermore, PD fluid with a low content of glucose degradation products did not induce EMT or COX-2; the peritoneal membranes of mice treated with this fluid showed less worsening than mice exposed to standard fluid. In conclusion, upregulation of COX-2 during EMT may mediate peritoneal inflammation, suggesting COX-2 inhibition as a potential strategy to ameliorate peritoneal deterioration in PD patients.

*J Am Soc Nephrol* 20: 582–592, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008020211

Peritoneal dialysis (PD) is a therapeutic option for the treatment of ESRD and is based on the use of the peritoneum as a semipermeable membrane across which ultrafiltration and diffusion take place.<sup>1,2</sup> Continuous exposure to nonphysiologic PD solutions and episodes of peritonitis or hemoperitoneum cause inflammation and injury to the peritoneal membrane (PM), which undergoes fibrosis, angiogenesis, and hyalinizing vasculopathy.<sup>3</sup> These morphologic alterations seem to be associated with increased small-solute transport rate and with ul-

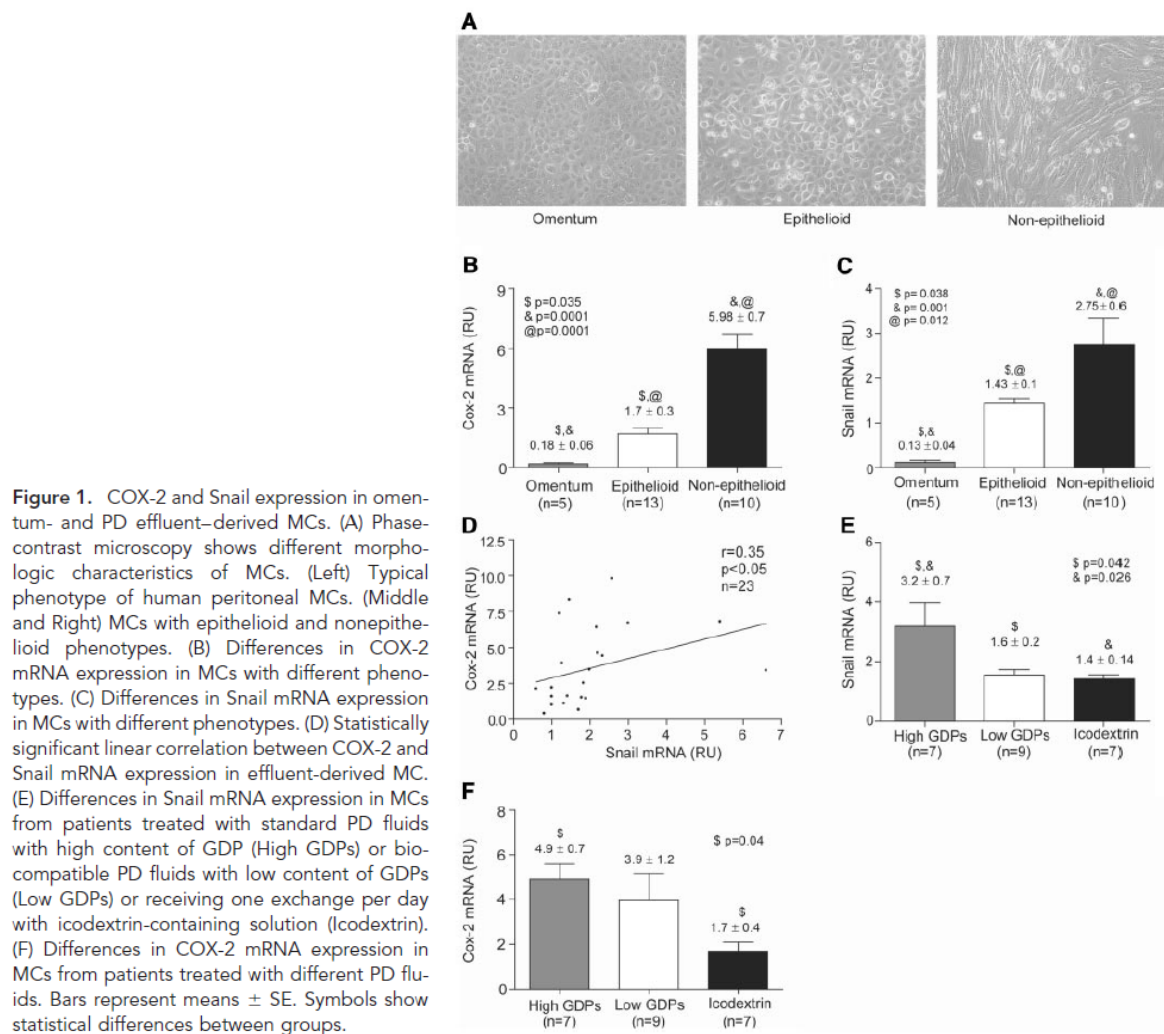
trafiltration dysfunction of the PM.<sup>2,3</sup> Resident myofibroblasts and infiltrating inflammatory cells

Received February 22, 2008. Accepted October 27, 2008.

Published online ahead of print. Publication date available at [www.jasn.org](http://www.jasn.org).

**Correspondence:** Dr. Manuel López-Cabrera, Unidad de Biología Molecular, Hospital Universitario de la Princesa, C/ Diego de León No. 62, 28006-Madrid, Spain. Phone: 34-91-5202334; Fax: 34-91-5202374; E-mail: [mlopez.hlpr@salud.madrid.org](mailto:mlopez.hlpr@salud.madrid.org)

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology



have been considered the main entities responsible of the structural and functional alterations of the peritoneum. More recently, however, it has been shown that mesothelial cells (MCs) may also play an active role in PM alteration.<sup>4</sup> It has been demonstrated that during PD-induced inflammatory and repair responses, MCs show a progressive loss of epithelial phenotype and acquire myofibroblast-like characteristics by an epithelial-mesenchymal transition (EMT).<sup>2,5,6</sup> The myofibroblastic conversion of MCs has been confirmed in an animal model based on intraperitoneal overexpression of TGF- $\beta$ 1.<sup>7</sup> The EMT of MCs is a complex process that is characterized by the increased expression of the transcriptional repressor Snail, which negatively regulates the expression of E-cadherin and other adhesion molecules, resulting in disruption of intercellular junctions. Then, MCs adopt a front-back polarity and acquire increased capacity to invade the submesothelial com-

pact zone, where they contribute to inflammatory responses, fibrosis, and angiogenesis that ultimately lead to PM failure.<sup>2,4,8</sup>

Cyclooxygenases (COX) are the rate-limiting enzymes that are involved in the synthesis of prostaglandins by oxidation of arachidonic acid.<sup>9</sup> Whereas COX-1 is constitutively expressed and is involved in homeostatic functions, COX-2 expression is inducible and is involved in a number of pathologic processes, including inflammation, angiogenesis, and tumor growth.<sup>9–11</sup> In regard to the role of COX-2 in fibrosis, both profibrotic and antifibrotic functions have been described for this enzyme.<sup>12–15</sup> Whether COX-2 is involved in PM deterioration during PD has not been explored in depth. It has been shown that prostaglandins are locally produced in the peritoneal cavity of PD patients and that their synthesis increases during peritonitis, which results in enhanced peritoneal permeability to macro-

Table 1. Baseline characteristics of PD patients with different phenotypes of MC<sup>a</sup>

| Parameter                     | Studied Population<br>(n = 23) | Effluent MC Phenotypes  |                            | P           |
|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------|
|                               |                                | Epithelioid<br>(n = 13) | Nonepithelioid<br>(n = 10) |             |
| Age (yr)                      | 67.88 ± 14.60                  | 65.20 ± 11.10           | 68.20 ± 16.00              | NS          |
| Time on PD (mo)               | 9.47 ± 7.44                    | 8.80 ± 5.00             | 11.30 ± 8.40               | NS          |
| EPO (U/kg per wk)             | 88.80 ± 54.10                  | 80.10 ± 46.20           | 93.50 ± 52.10              | NS          |
| Inflammation (d) <sup>b</sup> | 1.80 ± 0.840 (1.00 to 3.00)    | 0.00 ± 0.00             | 1.80 ± 0.84                | 0.0001      |
| Glucose load (kg)             | 44.10 ± 28.10                  | 42.20 ± 22.60           | 48.50 ± 31.10              | NS          |
| Urea-MTC (ml/min)             | 22.10 ± 3.30                   | 20.80 ± 3.23            | 23.92 ± 2.60               | NS          |
| Cr-MTC (ml/min)               | 10.80 ± 7.30                   | 9.70 ± 1.00             | 12.43 ± 2.60               | 0.0600 (NS) |
| UF 3.86% (ml) <sup>c</sup>    | 641.70 ± 89.30                 | 650.00 ± 57.70          | 631.00 ± 121.00            | 0.0800 (NS) |
| CCr (ml/min)                  | 1.30 ± 3.40                    | 1.50 ± 2.90             | 0.90 ± 3.70                | NS          |
| COX-2 mRNA (RU)               | 3.56 ± 2.75                    | 1.70 ± 1.00             | 5.98 ± 2.33                | 0.0001      |
| Snail mRNA (RU)               | 2.00 ± 1.40                    | 1.43 ± 0.40             | 2.75 ± 1.87                | 0.0120      |

<sup>a</sup>Data are means ± SD. CCr, clearance of creatinine; EPO, recombinant human erythropoietin; UF, ultrafiltration.

<sup>b</sup>The phenotypes of MC showed an association with episodes of peritonitis or hemoperitoneum. None of the patients with epithelioid MC in their effluents experienced these pathologic conditions, whereas 50% (five of 10) of patients with nonepithelioid MC had episodes of peritonitis (n = 3) or hemoperitoneum (n = 2; P < 0.05, two-tail Fisher exact test).

<sup>c</sup>Peritoneal exchange with glucose 3.86% during 4 h.

molecules.<sup>16,17</sup> The most possible sources of prostaglandins released into the PD dialysate are macrophages and MCs. Experiments *in vitro* have demonstrated that exposure of monocytes to advanced glycation end products results in increased COX-2 expression and prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) secretion<sup>18</sup> and that high glucose concentration increases PGE<sub>2</sub> synthesis in MCs.<sup>19</sup>

Herein, we demonstrate that COX-2 is upregulated during the EMT of MC and that peritoneal transport rate correlates with COX-2 expression *ex vivo*. We also show that COX-2 inhibition does not prevent EMT *in vitro* but ameliorates PM worsening *in vivo* in a mouse model of PD fluid exposure. The data point to COX-2 as key player in the setting and maintenance of peritoneal inflammation and reveal anti-inflammatory therapy as a strategy to preserve PM integrity in PD patients.

## RESULTS

### Upregulation of COX-2 Expression during the EMT of MCs in PD Patients

We analyzed the possible association of COX-2 upregulation with the EMT of MCs, a key process in PM dysfunction.<sup>2</sup> Effluent-derived MC from 23 clinically stable PD patients were grouped in epithelioid and nonepithelioid phenotypes according to their morphology at confluence (Figure 1A) and expression patterns of epithelial or mesenchymal markers.<sup>2</sup> Omentum-derived MC from five nonuremic donors were used as a control. The baseline characteristics of the patients and the differences between the subgroups according to the phenotype of effluent MCs are shown in Table 1. Quantitative reverse transcription-PCR analysis showed a progressive and significant upregulation of COX-2 mRNA expression *ex vivo* as EMT proceeded, with maximum increase in nonepithelioid MCs (Figure 1B). The expression of the EMT marker Snail also

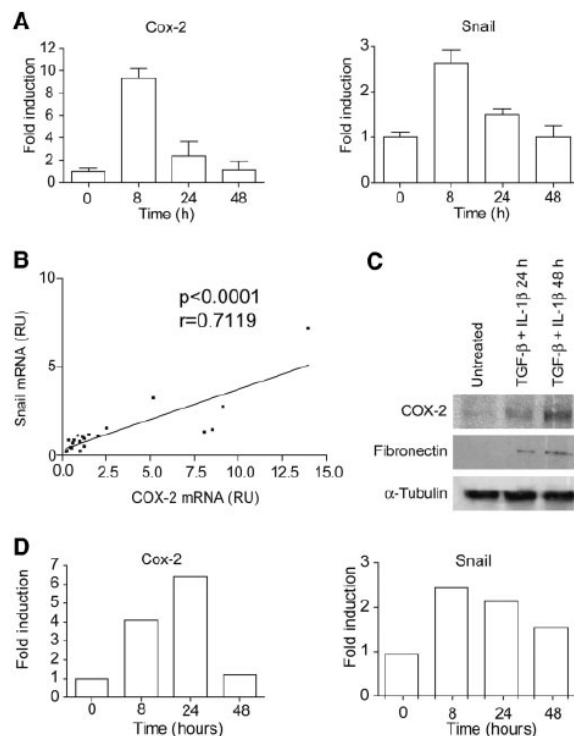
showed a progressive increase along the transdifferentiation process (Figure 1C). The expression of COX-2 and Snail mRNAs presented a significant correlation, indicating that COX-2 expression was augmented in cells that underwent an EMT (Figure 1D).

Interestingly, the phenotype of effluent MCs was associated with the PD fluids used in patients. The distribution of patients according to PD fluids is shown in Supplemental Table S1. All of the patients (seven of seven) treated with standard PD fluids, with high content of glucose degradation products (GDPs), contained nonepithelioid MCs in their effluents. In contrast, patients treated with PD fluids containing low GDP concentration and patients treated with standard fluids and receiving one exchange per day with icodextrin-containing solution showed nonepithelioid MCs in 33% (three of nine) and 0% (zero of seven) of the cases, respectively (two-tail Fisher test, high GDPs *versus* low GDPs, P = 0.01; high GDPs *versus* icodextrin, P = 0.001). Furthermore, the expression of Snail showed correlation with the type of PD fluid, its expression being significantly higher in patients treated with standard PD fluids when compared with patients treated with low GDP solutions and patients receiving one icodextrin exchange (Figure 1E). The expression of COX-2 was also significantly higher in the standard PD fluids group when compared with the icodextrin group, but it did not reach statistical significance when compared with the low GDP group (Figure 1F).

### Upregulation of COX-2 Expression during the EMT of MC In Vitro

The induction of COX-2 during EMT was confirmed *in vitro* using various stimuli. As shown in Figure 2A, omentum MC stimulated with TGF-β1 plus IL-1β showed a rapid and transient induction of COX-2 mRNA, which paralleled the expression pattern of Snail mRNA. As mentioned, the expression of COX-2 and Snail mRNAs showed a significant correlation





**Figure 2.** EMT of MC induced *in vitro* results in increased COX-2 and Snail expression. (A through D) EMT of MCs was induced *in vitro* by TGF- $\beta$  plus IL-1 $\beta$  stimulation (A through C) or by wound healing (D). (A) Induction of COX-2 and Snail mRNA expression at 8, 24, and 48 h in omentum-derived MCs. (B) Statistically significant linear correlation between Snail and COX-2 mRNA expression. (C) Western blot analysis of COX-2 and fibronectin expression at 24 and 48 h. (D) Induction of COX-2 and Snail mRNA expression at 8, 24, and 48 h after mechanical injury of MC monolayer. Bars in A represent the fold induction over untreated cells and are depicted as means  $\pm$  SE of three independent experiments conducted in duplicate. Bars in D show the fold induction over untreated cells of a representative experiment of three conducted.

(Figure 2B). The treatment with the cytokines also resulted in increased COX-2 protein expression in parallel with the mesenchymal marker fibronectin (Figure 2C). The upregulation of COX-2 during MC transdifferentiation was further verified by mechanical injury of confluent omentum-derived cell monolayers (Figure 2D).

Exposure of MCs to standard PD fluid, with high content of GDPs and buffered with lactate, resulted in a progressive downregulation of E-cadherin expression, indicative of EMT, and in a rapid and strong induction of PGE<sub>2</sub> secretion and COX-2 expression (Figure 3). When MCs were incubated with a more biocompatible PD fluid containing low GDP concentration and buffered with bicarbonate, the cells did not show

repression of E-cadherin; in fact, there was induction of this adhesion molecules at 24 h (Figure 3A), and the synthesis of PGE<sub>2</sub> and COX-2 was only slightly induced (Figure 3, B and C). Similar results were obtained with another low-GDP dialysis fluid buffered with lactate (Supplemental Figure S1).

#### Correlation between COX-2 Expression Ex Vivo and Peritoneal Transport Rate

Our data suggested that local upregulation of COX-2 in MCs could play an important role in the PM failure; therefore, we analyzed the correlation between COX-2 expression *ex vivo* by MCs and the transport characteristics of the PD patients. We observed a significant correlation ( $r = 0.6$ ,  $P < 0.001$ ) between COX-2 mRNA expression and mass transfer coefficient of creatinine (Cr-MTC; Figure 4A). When PD patients were subdivided into two groups according to their peritoneal transport characteristics—Cr-MTC  $\leq 11$  ml/min (low and low-average transporters) and Cr-MTC  $> 11$  (high and high-average transporters)—we observed significant higher expression of COX-2 mRNA *ex vivo* ( $P < 0.001$ ) in this last group (Figure 4B). In agreement with our previous study,<sup>4</sup> Cr-MTC was also associated with effluent MC phenotype. None of the patients with epithelioid MCs in their effluents showed Cr-MTC  $> 11$ , whereas 80% (eight of 10) of patients with nonepithelioid MCs showed Cr-MTC  $> 11$  (two-tail Fisher test,  $P < 0.01$ ). These results suggested that COX-2 upregulation during the EMT of MCs could play a role in the establishment of inflammatory response leading to PM deterioration in PD patients.

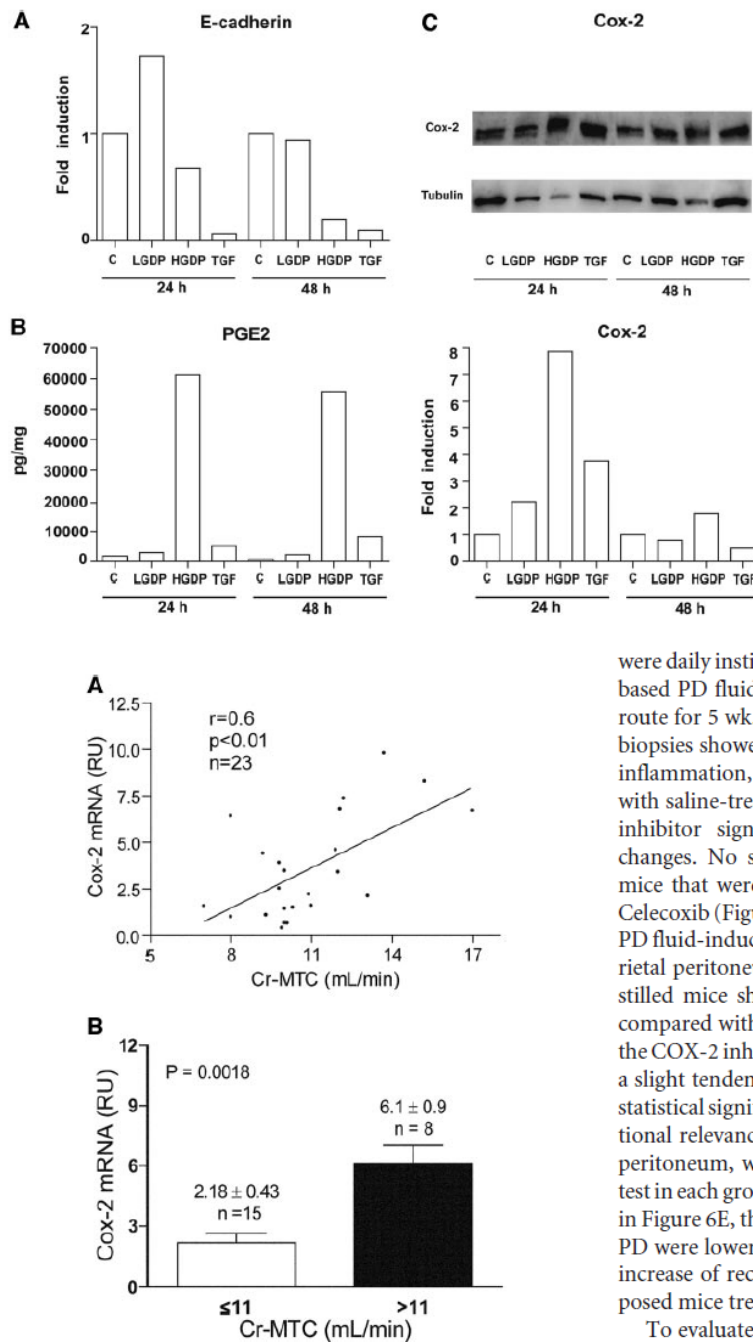
#### Inhibition of COX-2 Does not Affect EMT of MCs In Vitro

Because COX-2 expression was upregulated during the transdifferentiation of MCs, we investigated the role of COX-2 in the process of EMT. We analyzed the effect of the selective COX-2 inhibitor NS398 on EMT of MCs *in vitro*. The inhibitor did not prevent the TGF- $\beta$  plus IL-1–induced morphologic changes or E-cadherin downregulation (Figure 5, A and B). As expected, NS398 inhibited the synthesis of the COX-2 metabolite PGE<sub>2</sub> (Figure 5C). In contrast, COX-2 inhibitor did not affect the upregulation of EMT-associated molecules, including the matrix components fibronectin (Figure 5D) and collagen I (data not shown) and the proangiogenic factor vascular endothelial growth factor (VEGF; Figure 5E). These results demonstrated that COX-2, despite being induced during EMT, was not involved in the mesenchymal conversion of MCs.

#### Inhibition of COX-2 Ameliorates PD-Induced PM Inflammation and Structural Alteration

Peritoneal inflammation is an early response to PD fluid exposure, which in turn may promote the induction of EMT of MCs, the accumulation of extracellular matrix (ECM), and angiogenesis. Thus, we analyzed whether the anti-inflammatory action of the COX-2 inhibitor Celecoxib might prevent PM worsening in a mouse model of PD fluid exposure. Mice



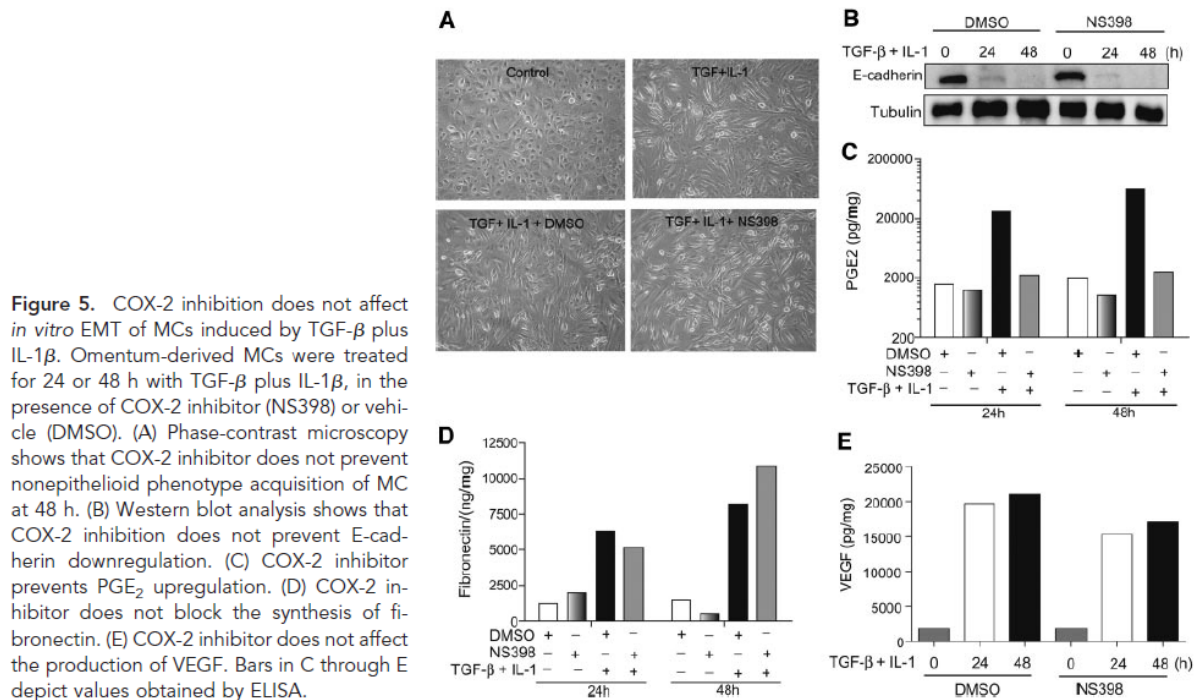


**Figure 4.** COX-2 expression in PD effluent MCs and peritoneal transport rate. (A) Linear correlation between COX-2 mRNA expression and Cr-MTC in the PD patient group. (B) Differences in COX-2 mRNA expression in MCs obtained from patients with low and low-average versus high and high-average (Cr-MTC  $\leq 11$  versus  $> 11$  mL/min) peritoneal transport rates. Bars represent means  $\pm$  SE.

**Figure 3.** Effects of standard and low-GDP solutions on EMT of MCs and on COX-2 expression *in vitro*. Omentum-derived MCs were incubated for 24 or 48 h with control medium (C), standard PD fluid containing high GDPs (HGDP), or solution containing low GDPs (LGDP) diluted one half with culture medium. Cells were also treated with TGF- $\beta$  plus IL-1 $\beta$  (TGF). (A) Expression of E-cadherin was determined by Western blot. (B) The synthesis of PGE<sub>2</sub> was measured in culture medium supernatant by ELISA, and results are depicted as picograms per milligram of total cellular proteins. (C) The expression of COX-2 was analyzed by Western blot. Bars in A and C represent the fold induction of E-cadherin and COX-2 expression over the control after normalization with tubulin expression. The experiment was repeated at least three times, and a representative experiment is shown.

were daily instilled *via* catheters with saline or standard lactate-based PD fluid and treated with Celecoxib or vehicle by oral route for 5 wk. The histologic analysis of parietal peritoneum biopsies showed that PD fluid exposure resulted in increased inflammation, ECM accumulation, and thickness compared with saline-treated groups. The administration of the COX-2 inhibitor significantly reduced all of these morphologic changes. No significant differences were observed between mice that were instilled with saline and treated or not with Celecoxib (Figure 6, A and B). To test the effect of Celecoxib on PD fluid-induced angiogenesis, we stained blood vessels of parietal peritoneum with an anti-CD31 antibody. PD fluid-instilled mice showed a significant increase of vessel number compared with saline-instilled groups. The administration of the COX-2 inhibitor to PD fluid-instilled mice resulted only in a slight tendency to reduce angiogenesis, but it did not reach statistical significance (Figure 6, C and D). To analyze the functional relevance of the observed morphologic changes of the peritoneum, we performed a 90-min peritoneal equilibrium test in each group of mice at the last day of treatment. As shown in Figure 6E, the volumes recovered from animals treated with PD were lower than those from saline-treated mice. A partial increase of recovered volumes was obtained in PD fluid-exposed mice treated with Celecoxib.

To evaluate the effect of COX-2 inhibition on the early inflammatory response of the peritoneum, we exposed mice to PD fluid and either treated them or not with Celecoxib for 15 d. The analysis of peritoneal influx of inflammatory cells showed a significant reduction of total cell counts in Celecoxib-treated mice. The decrease of cell infiltration was more evident in macrophages (CD11b<sup>+</sup>), because the reduction of T cells (CD3<sup>+</sup>) did not reach statistical differences (Figure 6F). These results



**Figure 5.** COX-2 inhibition does not affect *in vitro* EMT of MCs induced by TGF- $\beta$  plus IL-1 $\beta$ . Omentum-derived MCs were treated for 24 or 48 h with TGF- $\beta$  plus IL-1 $\beta$ , in the presence of COX-2 inhibitor (NS398) or vehicle (DMSO). (A) Phase-contrast microscopy shows that COX-2 inhibitor does not prevent nonepithelioid phenotype acquisition of MC at 48 h. (B) Western blot analysis shows that COX-2 inhibition does not prevent E-cadherin downregulation. (C) COX-2 inhibitor prevents PGE<sub>2</sub> upregulation. (D) COX-2 inhibitor does not block the synthesis of fibronectin. (E) COX-2 inhibitor does not affect the production of VEGF. Bars in C through E depict values obtained by ELISA.

demonstrated that COX-2 inhibition ameliorated the deleterious effects of PD fluid exposure of PM by reducing inflammation and fibrosis, which in turn resulted in improved ultrafiltration. The data also indicated that inflammation was an upstream event in peritoneal fibrosis and probably in vessel permeability, and that inflammation-independent mediators operated in new vessel formation.

#### Exposure to Low-GDP Solution Results in Decreased PM Inflammation and Structural Alteration

Because the incubation of MCs with low-GDP solutions had little impact on EMT and on the expression of COX-2, we analyzed whether the exposure of mouse PM to biocompatible fluids resulted in ameliorated PM worsening. Mice were daily instilled with standard PD fluid or with a solution containing low GDP concentration. The inflammatory response was analyzed at days 7 and 35, and PM thickness was determined at day 35. The analysis of peritoneal influx of inflammatory cells during the time course showed that total cell counts increased in the standard fluid-treated group but not in the group instilled with low-GDP fluid. The number of infiltrating cells in the group treated with low-GDP fluid was significantly smaller than in the standard fluid-treated group at day 35 (Figure 7A). The initial percentage of recruited T lymphocytes (CD3<sup>+</sup> cells) at day 7 was significantly reduced in the low-GDP fluid-treated group, whereas at day 35, there was no difference among groups (Figure 7B). The recruitment of macrophages (CD11b<sup>+</sup> cells) was reduced in the group treated with low-GDP fluid at both time points, but the differences among

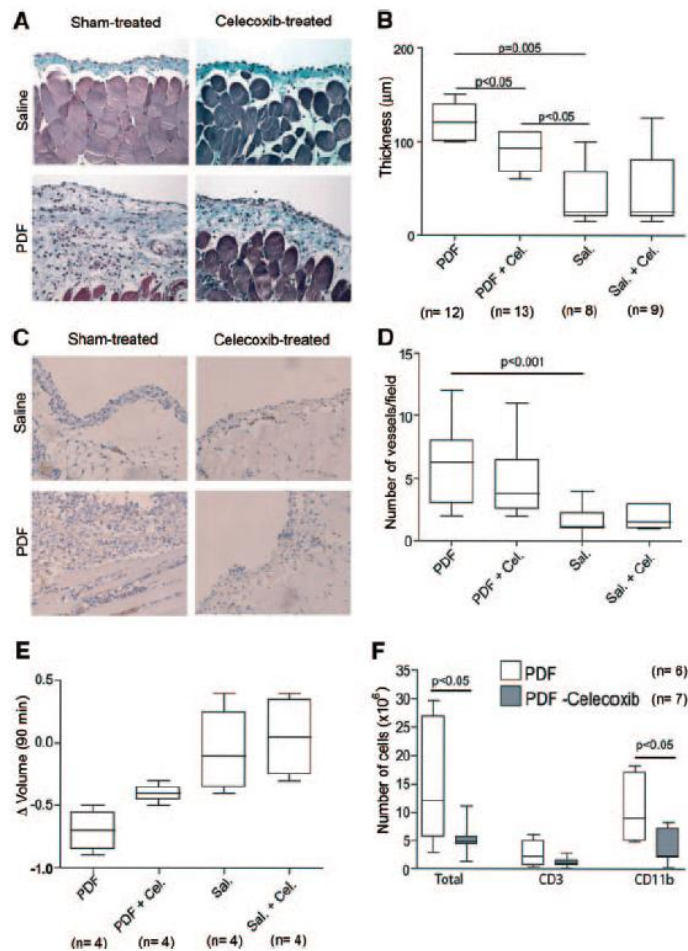
groups reached statistical significance only at day 35 (Figure 7C). Finally, at day 35, the low-GDP fluid-treated group showed a significant decrease of submesothelial fibrosis compared with the standard fluid-treated group (Figure 7D). These findings demonstrated that mice exposed to PD fluid with low content of GDPs showed less PM worsening.

#### DISCUSSION

The possible involvement of COX-2 in PM deterioration during PD has remained elusive. Prostaglandins are produced in the peritoneal cavity of PD patients, mostly during peritonitis, and are implicated in increased peritoneal permeability to macromolecules.<sup>16,17</sup> Interestingly, whereas the inhibition of prostaglandin synthesis, by intraperitoneal administration of indomethacin, results in a decrease of hyperpermeability to macromolecules during peritonitis, it has no effect on permeability in clinically stable and uncomplicated PD patients.<sup>20,21</sup> These findings suggest that only the augmented prostaglandins, probably those produced by the inducible COX-2, are involved in peritoneal transport dysfunction.

Herein, we demonstrate that effluent MCs with nonepithelioid phenotype show increased expression of COX-2 and that peritoneal transport rate correlates with COX-2 expression levels, suggesting that MCs that have undergone an EMT are an important source of prostaglandins and thus contribute to peritoneal inflammatory response in PD patients. We also show that effluent MC phenotypes and the expression of Snail





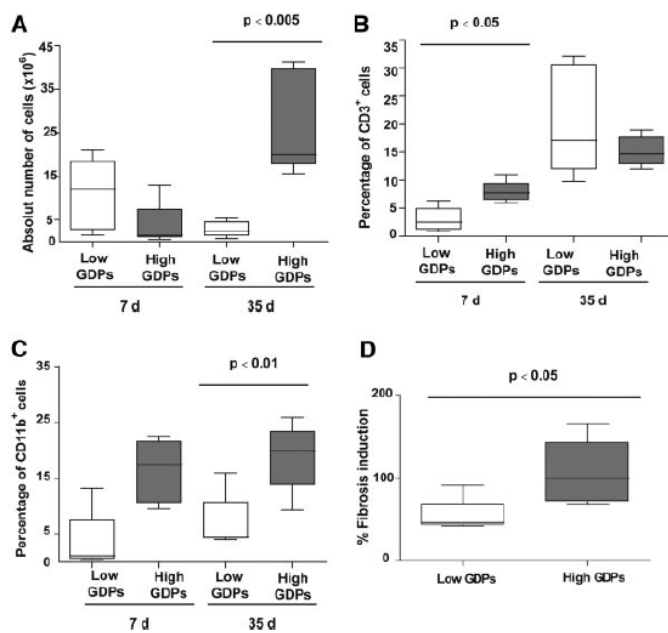
**Figure 6.** Inhibition of COX-2 ameliorates PD-induced PM worsening. (A and B) Standard PD fluid exposure results in an increase of ECM deposition (A) and thickness (B) of the PM, and Celecoxib treatment significantly reduces these effects, as measured by Masson's trichrome staining. (C and D) CD31 staining of peritoneal samples reveals that PD fluid exposure induces angiogenesis and that Celecoxib treatment does not significantly affect the increase in blood vessel formation. (E) Celecoxib treatment improves PM function (ultrafiltration) of PD fluid-instilled mice. (F) Celecoxib reduces peritoneal inflammation of mice exposed to PD fluid. (A through E) Mice received a daily instillation of PD fluid or saline for 5 wk. After that period, samples were prepared and analyzed as described in the Concise Methods section. (F) For the study of the effect of Celecoxib on PD fluid-induced inflammation, mice were exposed to PD fluid for 15 d. At the end of the experiment, the drained cells were counted and analyzed by flow cytometry. CD3 represents intraperitoneal T lymphocytes and CD11b myeloid cell population. Box plots represent 25th and 75th percentiles and median, minimum, and maximum values.

and COX-2 are associated with the PD fluids used in patients. Treatments with standard PD fluids have a greater impact on EMT of MCs and on the expression of Snail and COX-2 than

treatments with low-GDP solutions or with a combination of standard and icodextrin-based fluids.

That COX-2 upregulation in MCs paralleled that of the EMT inducer Snail prompted us to analyze whether it could play a role in the transdifferentiation process of these cells; however, *in vitro* experiments demonstrated that inhibition of COX-2 did not prevent TGF- $\beta$  plus IL-1-induced EMT of MCs and did not affect the expression of EMT-associated molecules. In contrast, it was recently shown that in MCs stimulated with high glucose, the inhibition of COX-2 prevented TGF- $\beta$  and ECM upregulation.<sup>22</sup> An explanation to these apparent discrepancies could be that the inhibition of COX-2 *in vitro* prevents the indirect effect of high glucose on ECM production, *via* inhibition of TGF- $\beta$  synthesis,<sup>22</sup> but not the direct effect of inflammatory cytokines on the EMT of MCs.

We demonstrate that Celecoxib treatment preserves the PM of PD fluid-instilled mice. Because inflammation is an early response of peritoneum to PD fluid-mediated insult, the beneficial effect of Celecoxib could be a consequence of its anti-inflammatory properties.<sup>9</sup> It is known that tissue injuries in adult mammals caused by traumas or surgeries induce inflammation and scar formation as a consequence of an imperfect healing process.<sup>23</sup> In contrast, during the fetal period or soon after birth, injury-induced inflammatory response is weak and the healing takes place without scar formation.<sup>23</sup> In addition, it has been shown that mice deficient in macrophages, neutrophils, and mast cells (PU.1 null mice) are impaired to mount a standard inflammatory response and show scar-free healing.<sup>24</sup> Thus, the participation of inflammation in tissue repair does not seem to be essential.<sup>25</sup> It is tempting to speculate that the inhibition of inflammation, by Celecoxib treatment, contributes to the reduction of peritoneal fibrosis in mice exposed to PD fluid. Our data indicate that PD fluid-induced angiogenesis is only slightly reduced in mice treated with Celecoxib. This may be explained by the fact that not only inflammatory cells but also injured MCs are able to produce different proangiogenic factors<sup>26,27</sup>; therefore, whereas Celecoxib treatment may block the production of angiogenic factors by inflammatory cells, it has no effect on the synthesis of these factors by MCs. In addition, under stress conditions, resident peritoneal fibroblasts may account for the production of angiogenic factors.<sup>28,29</sup> The partial recovery of PM function in animals exposed to PD fluid and treated with Celecoxib might be explained by the inhibition of PGE<sub>2</sub> synthesis, which results in decreased vascular permeability.<sup>8</sup> Our findings are further supported by the fact that mice exposed to low-GDP fluid, which does not induce EMT



**Figure 7.** Exposure to low-GDP solution results in decreased PM worsening. Mice (11 per group) were daily instilled with 1.5 ml of low GDP solution (□) or standard PD fluid containing high GDPs (■), both composed of 4.25% glucose. (A) Total peritoneal influx of inflammatory cells was analyzed by flow cytometry at days 7 (five mice per group) and 35 (six mice per group). (B and C) The percentages of CD3<sup>+</sup> cells (T lymphocytes) and CD11b<sup>+</sup> cells (macrophages) were also determined by flow cytometry at days 7 and 35. (D) Peritoneal thickness was measured at day 35, and results are depicted as percentage of fibrosis induction, 100% being the mean value of the high-GDP group. Box plots represent 25th and 75th percentiles and median, minimum, and maximum values.

of MCs and COX-2 expression *in vitro*, show fewer infiltrating inflammatory cells and decreased fibrosis than mice treated with standard fluid, demonstrating the benefit of using biocompatible PD solutions.

The results presented in this work indicate that inflammation is an early response to PD fluid exposure, which in turn leads to peritoneal fibrosis, whereas angiogenesis does not seem to be entirely dependent on inflammatory reaction. The inhibition of COX-2 or the prevention of its expression by using biocompatible PD fluids may ameliorate the deleterious effect of PD on PM, by reducing inflammation, ECM accumulation, and thickness, which results in improved ultrafiltration. We are aware that COX-2 inhibitors cannot be easily used in clinical practice, at least for long-term treatments, because major concerns about the cardiovascular safety of these drugs have been raised.<sup>30</sup> This issue is particularly important in patients with ESRD, which have prevalent cardiovascular risk<sup>31</sup>; however, we believe that our results provide evidence about the feasibility of considering inflammation as a potential therapeutic target to ameliorate PD-related PM deterioration. Further studies of peritoneal inflammatory reaction will provide

more specific interventions with minimum adverse effects on cardiovascular risk.

## CONCISE METHODS

### Patients

We included 23 clinically stable PD patients: 12 men and 11 women. The causes of renal failure were nephrosclerosis ( $n = 6$ ), glomerulonephritis ( $n = 6$ ), diabetes ( $n = 4$ ), chronic pyelonephritis ( $n = 2$ ), polycystic kidney disease ( $n = 1$ ), unknown cause ( $n = 2$ ), and other causes ( $n = 2$ ). The baseline characteristics of the patients and the differences between the subgroups according to the phenotype of effluent MCs are shown in Table 1. The age of patients ranged from 21 to 83 yr (mean  $67.88 \pm 14.60$ ). The mean period PD was  $9.47 \pm 7.44$  mo (range 3 to 25). Most patients (21 of 23) received recombinant human erythropoietin during this study. The duration of active peritoneal inflammation was defined as the time (days) from elevation of cell count in PD effluent until normalization of cell count. Three patients showed peritonitis, and two experienced hemoperitoneum. All of the patients who experienced peritonitis or hemoperitoneum drained nonepithelioid MCs in the effluents. For these patients, at least 3 mo passed after the resolution of the pathologic conditions before sampling the effluent-derived MC. Peritoneal glucose load was calculated by the sum of glucose contained in each PD-fluid bag during the whole time on PD. urea-MTC and Cr-MTC were measured using standard methods.<sup>32</sup> Ultrafiltration capacity was defined by a peritoneal exchange of 4 h using 3.86% glucose.<sup>33</sup>

At the moment of effluent-derived MC sampling, seven patients were on continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and 16 were on APD. Fourteen patients (five on CAPD and nine on APD) were treated with standard solution based on glucose and lactate, containing high GDP concentration (Dianeal; Baxter Healthcare Corp., Deerfield, IL). Seven of these patients (five on CAPD and two on APD) received one long dwell per day (generally overnight) with icodextrin-containing solution (Extraneal; Baxter). Nine patients (two on CAPD and seven on APD) were treated with low-GDP solutions buffered with lactate in five cases (Balance; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Germany) or bicarbonate in four cases (BicaVera; Fresenius). The distribution of patients according to PD techniques and PD fluids is shown in Supplemental Table S1.

This study abides by the Declaration of Helsinki and was approved by the ethics committee of Hospital Universitario de la Princesa (Madrid, Spain). Written consent was obtained from the PD patients included in this study to use effluent samples. Oral informed consent was obtained from omentum donors submitted to elective surgeries.

### Culture of MCs and Reagents

MCs were obtained from PD effluents and from omentum samples using the methods described previously.<sup>34</sup> To standardize effluent MC harvesting in the high-GDP group ( $n = 14$ ), we obtained the cells



from a long dwell (generally overnight) with a PD fluid containing 2.27% glucose (Dianeal; Baxter). Effluent MCs from the low-GDP group were isolated from a long dwell with fluids containing 2.3% glucose and buffered with lactate ( $n = 5$ ; Balance; Fresenius) or with bicarbonate ( $n = 4$ ; BicaVera; Fresenius). From each patient, at least three independent effluent MC samples were obtained in a period of 2 mo, which showed phenotype stability, and one representative MC culture per patient was used in the study. All cells were cultured in Earle's M199 medium, supplemented with 20% FCS, 50 U/ml penicillin, 50  $\mu$ g/ml streptomycin, and 2% Biogro-2 (Biologic Industries, Ashrat, Israel). The purity of effluent and omentum-derived MC cultures was determined by the expression of standard mesothelial markers: Intercellular adhesion molecule 1, cytokeratins, and calretinin. These MC cultures were negative for von Willebrand factor excluding endothelial cell contamination.<sup>34</sup>

To induce EMT *in vitro*, we treated omentum-derived MC for 24 or 48 h with a combination of human recombinant TGF- $\beta$  (0.5 ng/ml) and IL-1 $\beta$  (2 ng/ml; R&D Systems, Minneapolis, MN), which has been proved to be a good model of EMT *in vitro*.<sup>4,6</sup> When indicated, the selective COX-2 inhibitor NS398 (Alexis Biochemicals, San Diego, CA) was used at a final concentration of 20  $\mu$ M. Wound-healing studies were carried out as described previously by performing a mechanical injury with a 1.5-mm cell scraper.<sup>6</sup> To analyze the effect of GDPs on EMT and COX-2 expression, omentum-derived MC were incubated for 24 or 48 h with standard PD fluid composed of 4.25% glucose and buffered with lactate (Stay Safe; Fresenius) or low-GDP solutions composed of 4.25% glucose and buffered with lactate or bicarbonate (Balance or BicaVera; Fresenius) diluted one half with culture medium.

#### RNA Extraction and Reverse Transcription-PCR

Total RNA was extracted by using RNeasy (Ambion, Austin, TX), and the complementary DNA was obtained from 1  $\mu$ g of total RNA by reverse transcription following the manufacturer's recommendation (Applied Biosystems, Cheshire, UK). COX-2 mRNA was amplified with a LightCycler using a SYBR Green Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and the specific primer set 5'-TTCAAATGAGATTGTGGGAAAATTGCT-3' and 5'-AGATCA-TCTCTGCCTGAGTATCTT-3' as described previously.<sup>35</sup> Snail mRNA was amplified using similar conditions and the following primer set: 5'-CACATCCTTCTCACTGCCATG-3' and 5'-GCATCTAAACTCTAGTCTGC-3'.  $\beta$ -Actin was amplified using commercial primers (Clontech, Palo Alto, CA). Annealing temperatures for the COX-2, Snail, and  $\beta$ -actin PCR were 56, 53, and 60°C, respectively. All samples were normalized with respect to the value obtained for  $\beta$ -actin.

#### Western Blot Analysis and Enzyme-Linked Immunoassays

For Western blotting, MC cultures were lysed in a buffer (1% sodium deoxycholate and 0.1% SDS), and total protein was quantified using a total protein assay kit (Pierce, Cambridge, MA). MC proteins (50  $\mu$ g) were resolved in 8 to 10% SDS-polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes, which were blocked with fat-free milk and then incubated with specific antibodies against

COX-2, fibronectin, collagen I, E-cadherin, and  $\alpha$ -tubulin (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Membranes were incubated with goat anti-mouse IgG antibody conjugated with peroxidase (Pharmingen, San Diego, CA) and developed with enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Blot images were acquired with an LAS-1000 charged coupled device camera (Fujifilm, Cedex, France).

For the detection of VEGF and PGE<sub>2</sub> in culture supernatants, the media of MCs cultured under the various conditions were replaced, and 18 h later supernatants were collected and stored at -80°C until their analysis. The concentrations of VEGF and PGE<sub>2</sub> in supernatants were assessed by a standard ELISA kit (R&D Systems). The production of fibronectin under various conditions was measured in cell lysates by ELISA as recommended by the manufacturer (Biomedical Technologies, Stoughton, MA).

#### Peritoneal Exposure Model in Mice

A total of 112 female C57BL/6 mice with age between 12 and 16 wk were used in this study (Harlan Interfauna Iberica, Barcelona, Spain). The experimental protocol was in accordance with the National Institutes of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals and was approved by the Animal Ethics Committee of the Unidad de Cirugía Experimental of Hospital Universitario La Paz.

A customized vascular access port (Access Technologies, Skokie, IL) was implanted subcutaneously, and the catheter end was introduced into the peritoneal cavity by a chirurgic procedure. During the week of recovery, animals received daily 0.2 ml of saline solution containing 1 U/ml heparin. Thereafter, mice were subdivided into different groups. For histologic and functional analysis, 70 mice were used: 20 were daily instilled with 1.5 ml of standard PD fluid composed of 4.25% glucose and buffered with lactate (Stay Safe; Fresenius) and orally treated with vehicle (PDF group), 20 were instilled with PD fluid and orally treated with Celecoxib (2  $\mu$ g/g body wt; PDF + Cel group), 15 were daily instilled with 1.5 ml of physiologic saline and orally treated with vehicle (Sal group), and 15 were instilled with physiologic saline and orally treated with Celecoxib (Sal + Cel group). Mice were treated with different conditions for 5 wk. The whole study was performed in four separate experiments. In one experiment, a peritoneal equilibrium test was performed during the last day of treatment with the various conditions. Mice were instilled with 1.5 ml of PD solution; 90 min later, animals were killed and the total peritoneal volumes were collected. The peritoneal net volume was determined by the difference between instilled and recovered volumes. For histologic analyses, specimens of the parietal peritoneum were collected. Sample were fixed in neutral-buffered formalin, embedded in paraffin, cut into 5- $\mu$ m sections, and stained either with hematoxylin and eosin or Masson's trichrome. The thickness of sub-mesothelial tissue was determined by blinded microscope analysis using a metric ocular. The presence of blood vessels was determined by immunostaining with an anti-CD31 mAb (Becton Dickinson). Blood vessels of five fields per mouse sample were counted, and the median was used for statistical analysis.

To analyze the effect of Celecoxib in early inflammatory response to PD fluid exposure, we used 20 mice. Mice (10 per group) were daily instilled with 1.5 ml of standard PD solution (Stay Safe; Fresenius)



and orally treated with Celecoxib or vehicle alone during 15 d. Then, the peritoneal influx of inflammatory cells was analyzed by flow cytometry using anti-CD11b and anti-CD3 mAb (Becton Dickinson).

During these experiments, the percentages of dropouts were similar in all of the groups (approximately 40%), the main cause being catheter damage produced by the mouse itself and not as a consequence of treatments. There were no significant differences in weight gain among the various groups.

To compare the effects of PD fluids with different contents of GDPs on PM inflammation and fibrosis, we used 22 mice. Mice (11 per group) were daily instilled with 1.5 ml of standard PD fluid composed of 4.25% glucose and lactate (Stay Safe; Fresenius) or with low-GDP solution composed of 4.25% glucose and bicarbonate (BicaVera; Fresenius). The peritoneal influx of inflammatory cells was analyzed by flow cytometry at days 7 (five mice per group) and 35 (six mice per group). Peritoneal thickness was also determined at day 35. In this experiment, no dropout was observed as a result of technical improvement of surgical implantation of catheters.

### Statistical Analysis

Results are given as means  $\pm$  SD (Table 1). Figures 1, B through F, 2A, and 4B represent means  $\pm$  SE. Comparisons between data groups were performed using the nonparametric Mann-Whitney rank sum *U* test. Linear correlation was determined by Spearman regression analysis (Figures 1D, 2B, and 4A).  $\chi^2$  and two-tailed Fisher exact tests were used to compare qualitative variables.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. We used SPSS 14.5 (Chicago, IL) and GraphPad Prism 4.0 (La Jolla, CA).

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants SAF2007-61201 and PET2006-0256 from Ministerio de Educación y Ciencia to M.L.-C. and FIS PI 06/0098 and RETICS 06/0016 from Fondo Investigaciones Sanitarias to R.S. This work was also partially supported by Fresenius Medical Care and Gambro Europe.

We thank the nurses from the peritoneal dialysis units for help in recompilation of peritoneal effluents and omental samples. We also thank Javier Benito de la Víbora, DVM, and Carlota Largo Aramburu, DVM, PhD, for the assistance with mouse care.

### DISCLOSURES

None.

### REFERENCES

- Krediet RT: The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 55: 341–356, 1999
- Aroeira LS, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, del Peso G, Jimenez-Heffernan JA, Selgas R, Lopez-Cabrera M: Epithelial to mesenchymal transition and peritoneal membrane failure in peritoneal dialysis patients: Pathologic significance and potential therapeutic interventions. *J Am Soc Nephrol* 18: 2004–2013, 2007
- Williams JD, Craig KJ, Topley N, Von Ruhland C, Fallon M, Newman GR, Mackenzie RK, Williams GT: Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 13: 470–479, 2002
- Aroeira LS, Aguilera A, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, Cirugeda A, Bajo MA, del Peso G, Sanchez-Tomero JA, Jimenez-Heffernan JA, Lopez-Cabrera M: Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: Role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* 46: 938–948, 2005
- Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Bajo MA, del Peso G, Ramirez M, Gamallo C, Sanchez-Tomero JA, Alvarez V, Lopez-Cabrera M, Selgas R: Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* 444: 247–256, 2004
- Yanez-Mo M, Lara-Pezzi E, Selgas R, Ramirez-Huesca M, Dominguez-Jimenez C, Jimenez-Heffernan JA, Aguilera A, Sanchez-Tomero JA, Bajo MA, Alvarez V, Castro MA, del Peso G, Cirugeda A, Gamallo C, Sanchez-Madrid F, Lopez-Cabrera M: Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* 348: 403–413, 2003
- Margetts PJ, Bonniaud P, Liu L, Hoff CM, Holmes CJ, West-Mays JA, Kelly MM: Transient overexpression of TGF- $\beta$ 1 induces epithelial mesenchymal transition in the rodent peritoneum. *J Am Soc Nephrol* 16: 425–436, 2005
- Yang AH, Chen JY, Lin JK: Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* 63: 1530–1539, 2003
- Turini ME, DuBois RN: Cyclooxygenase-2: A therapeutic target. *Annu Rev Med* 53: 35–57, 2002
- Gately S, Li WW: Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: A target for antiangiogenic therapy. *Semin Oncol* 31: 2–11, 2004
- Khanapure SP, Garvey DS, Janero DR, Letts LG: Eicosanoids in inflammation: Biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. *Curr Top Med Chem* 7: 311–340, 2007
- Bonner JC, Rice AB, Ingram JL, Moomaw CR, Nyska A, Bradbury A, Sessoms AR, Chulada PC, Morgan DL, Zeldin DC, Langenbach R: Susceptibility of cyclooxygenase-2-deficient mice to pulmonary fibrogenesis. *Am J Pathol* 161: 459–470, 2002
- Cheng HF, Wang CJ, Moeckel GW, Zhang MZ, McKanna JA, Harris RC: Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int* 62: 929–939, 2002
- Wilborn J, Crofford LJ, Burdick MD, Kunkel SL, Strieter RM, Peters-Golden M: Cultured lung fibroblasts isolated from patients with idiopathic pulmonary fibrosis have a diminished capacity to synthesize prostaglandin E2 and to express cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 95: 1861–1868, 1995
- Yamamoto H, Kondo M, Nakamori S, Nagano H, Wakasa K, Sugita Y, Chang-De J, Kobayashi S, Damsinsuren B, Dono K, Umeshita K, Sekimoto M, Sakon M, Matsuura N, Monden M: JTE-522, a cyclooxygenase-2 inhibitor, is an effective chemopreventive agent against rat experimental liver fibrosis. *Gastroenterology* 125: 556–571, 2003
- Steinhauer HB, Schollmeyer P: Prostaglandin-mediated loss of proteins during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* 29: 584–590, 1986
- Zemel D, Koomen GC, Hart AA, ten Berge IJ, Struijk DG, Krediet RT: Relationship of TNF- $\alpha$ , interleukin-6, and prostaglandins to peritoneal permeability for macromolecules during longitudinal follow-up of peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* 122: 686–696, 1993
- Shanmugam N, Kim YS, Lanting L, Natarajan R: Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* 278: 34834–34844, 2003
- Sitter T, Haslinger B, Mandl S, Fricke H, Held E, Sellmayer A: High glucose increases prostaglandin E2 synthesis in human peritoneal

- mesothelial cells: role of hyperosmolarity. *J Am Soc Nephrol* 9: 2005–2012, 1998
20. Douma CE, de Waart DR, Zemel D, Struijk DG, Krediet RT: Prostaglandin inhibition by intraperitoneal indomethacin has no effect on peritoneal permeability during stable CAPD. *Nephrol Dial Transplant* 16: 803–808, 2001
  21. Zemel D, Struijk DG, Dinkla C, Stolk LM, ten Berge IJ, Krediet RT: Effects of intraperitoneal cyclooxygenase inhibition on inflammatory mediators in dialysate and peritoneal membrane characteristics during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* 126: 204–215, 1995
  22. Liu H, Peng Y, Liu F, Li J, Chen X, Liu Y, Zhang H: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor decreases transforming growth factor-beta1 synthesis and matrix production in human peritoneal mesothelial cells. *Cell Biol Int* 31: 508–515, 2007
  23. Ferguson MW, O’Kane S: Scar-free healing: From embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359: 839–850, 2004
  24. Martin P, D’Souza D, Martin J, Grose R, Cooper L, Maki R, McKercher SR: Wound healing in the PU.1 null mouse: Tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* 13: 1122–1128, 2003
  25. Martin P, Leibovich SJ: Inflammatory cells during wound repair: The good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 15: 599–607, 2005
  26. Lai KN, Lai KB, Lam CW, Chan TM, Li FK, Leung JC: Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* 35: 644–652, 2000
  27. Lai KN, Tang SC, Leung JC: Mediators of inflammation and fibrosis. *Perit Dial Int* 27[Suppl 2]: S65–S71, 2007
  28. Giatromanolaki A, Kotsiou S, Koukourakis MI, Sivridis E: Angiogenic factor expression in hepatic cirrhosis. *Mediators Inflamm* 2007: 67187, 2007
  29. Tunyogi-Csapo M, Koreny T, Vermes C, Galante JO, Jacobs JJ, Glant TT: Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis. *J Orthop Res* 25: 1378–1388, 2007
  30. Harris RC, Breyer MD: Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. *Clin J Am Soc Nephrol* 1: 236–245, 2006
  31. Garcia-Lopez E, Carrero JJ, Suliman ME, Lindholm B, Stenvinkel P: Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* 27[Suppl 2]: S205–S209, 2007
  32. Selgas R, Fernandez-Reyes MJ, Bosque E, Bajo MA, Borrego F, Jimenez C, Del Peso G, De Alvaro F: Functional longevity of the human peritoneum: How long is continuous peritoneal dialysis possible? Results of a prospective medium long-term study. *Am J Kidney Dis* 23: 64–73, 1994
  33. Ho-dac-Pannekeet MM, Atasever B, Struijk DG, Krediet RT: Analysis of ultrafiltration failure in peritoneal dialysis patients by means of standard peritoneal permeability analysis. *Perit Dial Int* 17: 144–150, 1997
  34. Lopez-Cabrera M, Aguilera A, Aroeira LS, Ramirez-Huesca M, Perez-Lozano ML, Jimenez-Heffeman JA, Bajo MA, del Peso G, Sanchez-Tomero JA, Selgas R: *Ex vivo* analysis of dialysis effluent-derived mesothelial cells as an approach to unveiling the mechanism of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* 26: 26–34, 2006
  35. Lara-Pezzi E, Gomez-Gavira MV, Galvez BG, Mira E, Iniguez MA, Fresno M, Martinez AC, Arroyo AG, Lopez-Cabrera M: The hepatitis B virus X protein promotes tumor cell invasion by inducing membrane-type matrix metalloproteinase-1 and cyclooxygenase-2 expression. *J Clin Invest* 110: 1831–1838, 2002

Supplemental information for this article is available online at <http://www.jasn.org/>.

• **IV.3.2.- Modulación de la inflamación: *Apartado IV.3.2.1.***

La regulación de la ruta metabólica de la vitamina D puede tener efecto sobre la inflamación. Además de su actividad clásica, diversos trabajos relacionan la vitamina D con respuesta a infección o vacunación<sup>135</sup>, enfermedades autoinmunes<sup>136</sup> o cáncer<sup>137</sup>. El receptor de la vitamina D, VDR, se encuentra en la mayor parte de las células del sistema inmune, particularmente en células presentadoras de antígenos como macrófagos y dendríticas, así como en células B y T<sup>138-139</sup>.

Por otra parte, se han propuesto diversos mecanismos a través de los cuales el VDR podría prevenir la fibrosis: previniendo la EMT<sup>140</sup>, inhibiendo la activación de miofibroblastos<sup>141</sup> o diferenciando precursores mesenquimales a un fenotipo no fibrogénico<sup>142</sup>. También se ha descrito que la vitamina D y su receptor pueden disminuir la formación de fibrosis mediante el secuestro de NF- $\kappa$ B<sup>143</sup>, inhibir a células Th1<sup>144-145</sup> y Th17<sup>146-147</sup>, afectar a la secreción de citoquinas inflamatorias, o reducir la producción de IL-17 en células T memoria<sup>146</sup>. Además, se ha descrito un efecto inmunosupresor de la vitamina D sobre linfocitos<sup>148</sup>, y varios trabajos demuestran que la vía de señalización del VDR estimula la diferenciación de células T a un fenotipo regulador<sup>149-151</sup>. Observaciones de nuestro grupo han demostrado la existencia del receptor de vitamina D en la célula mesotelial de peritoneo humano. Asimismo, hemos observado la capacidad de limitar el desarrollo de la EMT mediante un agente activador selectivo de VDR (Paricalcitol). Esto impulsó la decisión de analizar el efecto de este agente en el modelo animal.

En el presente trabajo demostramos que la administración intraperitoneal de Paricalcitol reduce la fibrosis y la angiogénesis de la MP inducidas por la exposición crónica a LD, mitigando el fallo de ultrafiltración. Observamos una reducción en la presencia de células inflamatorias en la MP, mientras que el número total de células en lavados de la cavidad peritoneal tiende a aumentar. En concreto, el tratamiento con Paricalcitol aumenta el número de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>; además, los números de ambas subpoblaciones de células T se correlacionan inversamente con el engrosamiento de la MP. Se observó también una disminución de IL-17, citoquina que correlaciona significativamente con la fibrosis.

Los resultados sugieren que el efecto beneficioso de Paricalcitol es consecuencia de la reducción en la producción de IL-17. El mecanismo parece ser, al menos en parte, dependiente de la activación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> que expresan un fenotipo regulador, los cuales podrían jugar un papel en la disminución de IL-17.

➤ *IV.3.2.1. Paricalcitol, activador selectivo del receptor de vitamina D, modula selectivamente la IL-17 y previene fibrosis en un modelo en ratón de DP*

**Paricalcitol<sup>®</sup>, a vitamin D receptor activator, selectively modulates inflammatory IL-17 and prevents fibrosis in a mouse model of peritoneal dialysis.**

Guadalupe Tirma González-Mateo<sup>1</sup>, Vanessa Fernández-Míllara<sup>1</sup>, Manuel López-Cabrera<sup>3</sup>, Marta Ruiz-Ortega<sup>4</sup>, Rafael Selgas<sup>1,2\*</sup>, Luiz Stark Aroeira<sup>1\*</sup>

\* Both authors contribute equally in the development of this work.

<sup>1</sup> Unidad de Investigación, Instituto de Investigación Hospital Universitario la Paz, Madrid, Spain

<sup>2</sup> Servicio de Nefrología, Instituto de Investigación Hospital Universitario la Paz, Madrid, Spain

<sup>3</sup> Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid, Spain

<sup>4</sup> Fundación Jimenez Díaz, Madrid, Spain

**Correspondence to:**

Luiz Stark Aroeira

Instituto de Investigación Hospital Universitario la Paz

Paseo de la Castellana, 261,

Madrid, 28046, Spain

**Abstract**

Fibroproliferative disorders are commonly associated with a chronic inflammatory process and sustained production of growth, angiogenic and fibrogenic factors. During peritoneal dialysis, exposition to the dialysis fluid induces chronic inflammation and fibrosis that ultimately lead to ultrafiltration failure and discontinuation of therapy. Control of inflammation could then be of benefit in preventing the fibrotic deterioration of the peritoneal membrane caused by dialysis. By using a mouse model of peritoneal dialysis, we show here that Paricalcitol, a vitamin D receptor specific agonist, prevents from the development of peritoneal membrane inflammation, angiogenesis and fibrosis resulting from chronic exposure to peritoneal dialysis fluid; thus protecting from ultrafiltration failure. This protective effect of Paricalcitol was associated with a markedly reduction in the amounts of peritoneal IL-17, but not of other inflammatory cytokines or chemokines; and with increased frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing Treg phenotypic markers. Since peritoneal abundance of IL-17 strongly correlated with fibrosis, our study indicates that Paricalcitol could be of therapeutic value in the prevention of peritoneal deterioration in patients under peritoneal dialysis.



## Introduction

Tissue repair begins very quickly after a trauma. It is a complex process involving several overlapping steps that starts with inflammation and followed by the formation of granular tissue, matrix extracellular deposition and remodeling. While acute inflammation is rapidly resolved and healing is almost perfect, during chronic inflammation, tissue remodeling and repair process occurs simultaneously generating an excess of matrix deposition and fibrosis (1). In spite of having different etiology and clinical manifestations, fibroproliferative disorders are associated with a chronic inflammation, that sustains the production of growth, angiogenic and fibrogenic factors (2, 3). Fibrosis is an important cause of morbidity and in the developed world its chronic form are related with approximately 45% of all death (4).

Fibroblasts are present in different tissue and are responsible for the production and turnover of extracellular matrix (ECM) molecules. At repair process, inflammatory cytokines activate fibroblasts that acquire the expression of  $\alpha$ -SMA (myofibroblasts) and improve ECM production (1). During healing resolution, myofibroblasts are eliminated by apoptosis and the repair is completed. However, a sustained inflammation prevents myofibroblast elimination leading to fibrosis formation. Therefore, anti-inflammatory and immunosuppressive therapies have been used to tackle fibrosis (5).

Peritoneal dialysis is an alternative therapy for chronic renal disease. It consists in the instillation of peritoneal dialysis fluid (PDF), a glucose-based hyper osmotic solution, into patient peritoneal cavity. It generates an osmotic gradient between peritoneal cavity and the blood stream. This permits the exhaustion of liquid excess and metabolites from the blood to peritoneal cavity. However, PDF is an irritating solution and, its continuous exposure to peritoneal cavity induces an aseptic chronic peritonitis that precipitates repair mechanism leading to peritoneal fibrosis, angiogenesis and ultrafiltration failure (6).

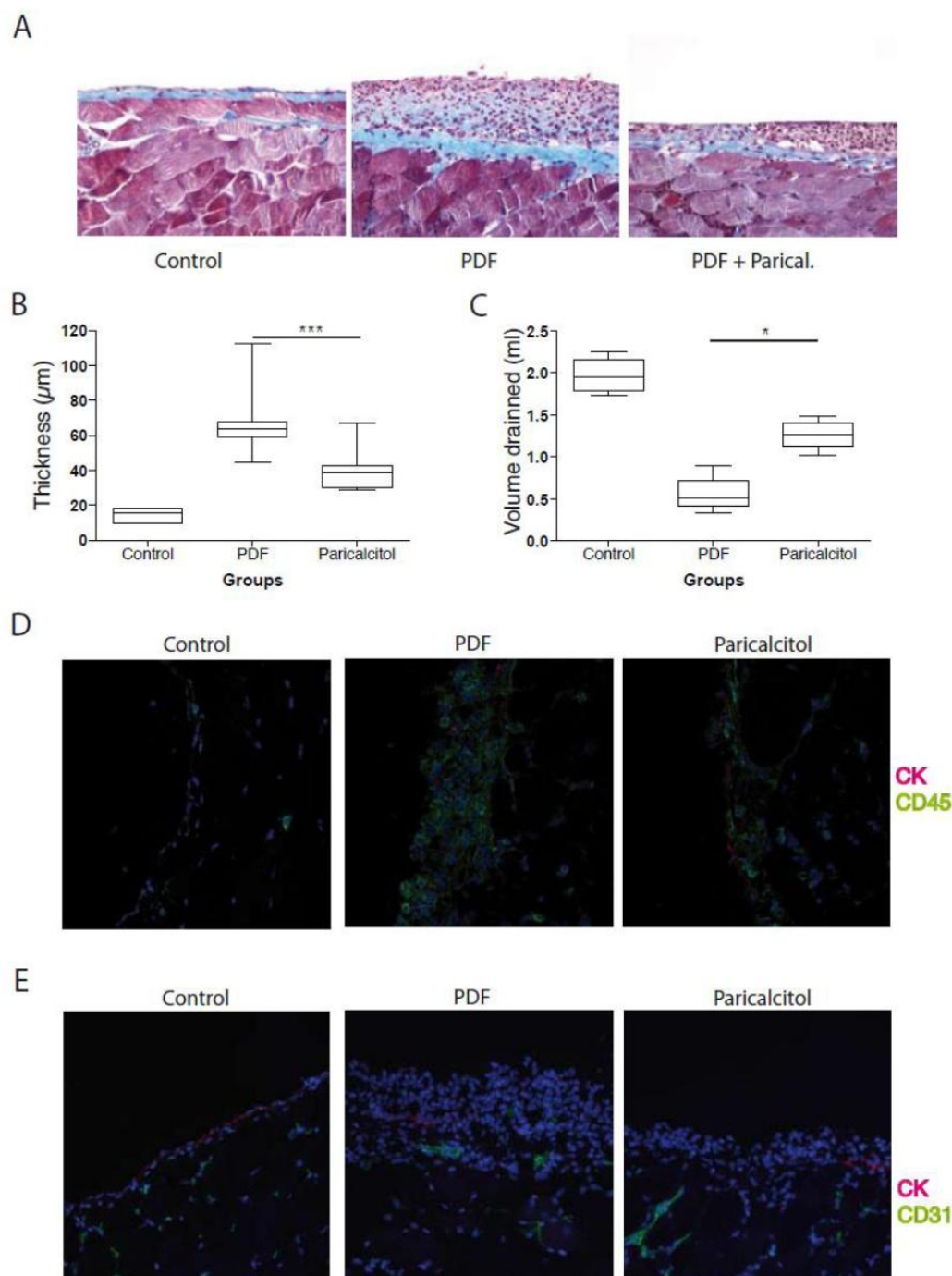
In addition to its classic metabolic action, vitamin D has also function on immune cells. The vitamin D receptor (VDR) is a hormone like receptor expressed in B, T, macrophages and dendritic cells, and regulates their proliferation and function (7). Vitamin D showed immune regulation activity that is illustrated by its ability to prevent or ameliorate animal models of autoimmune disease (8). Wherefore, we hypothesize that vitamin D could be able to interfere in fibrosis by the regulation of inflammation. To check this hypothesis, we study the effect of Paricalcitol<sup>®</sup>, a VDR selective activator, administered at peritoneal cavity of mice chronically exposed to PDF. Paricalcitol<sup>®</sup> administration reduced fibrosis and ultrafiltration failure induced by PDF instillation. Here, we show evidences which indicate that Paricalcitol<sup>®</sup> promotes accumulation of regulatory CD8<sup>+</sup> T cells at peritoneal cavity and a significantly IL-17 production that strongly correlate with peritoneal membrane thickness. These evidences demonstrate that Paricalcitol<sup>®</sup> treatment culminates in attenuation of deleterious effect of PDF-induced chronic inflammation, suggesting a potential therapeutic effect.



**Results**

*Intraperitoneal Paricalcitol<sup>®</sup> administration reduces deleterious effect of chronic PDF peritoneal exposure.*

Since inflammation is a key event on fibrosis development and that activation of VDR could modulate inflammation, we hypothesized that Paricalcitol<sup>®</sup> treatment may reduce fibrosis, improving peritoneal preservation. In order to address the effect of Paricalcitol<sup>®</sup> on inflammation and fibrosis, we used three groups of mice: a control group, with catheter, that did not received any instillation, thereafter called control; a group of mice which received daily PDF instillation and thereafter called PDF; and a group that received daily PDF plus Paricalcitol<sup>®</sup> instillation and thereafter called Paricalcitol. Compared to control group, mice from PDF and Paricalcitol group presented a dramatic thickening of peritoneal membrane due to increased cell number and collagen deposition shown by specific blue in Masson's trichrome staining, that characterizes PDF-induced fibrosis (Figure 1A). However, treatment with Paricalcitol<sup>®</sup> importantly protects from peritoneal membrane thickening, through reduction of peritoneal membrane cell number and collagen deposition. The morphometric analysis of peritoneal membrane demonstrates that Paricalcitol<sup>®</sup> prevents PDF-induced peritoneal membrane thickening (Figure 1B).



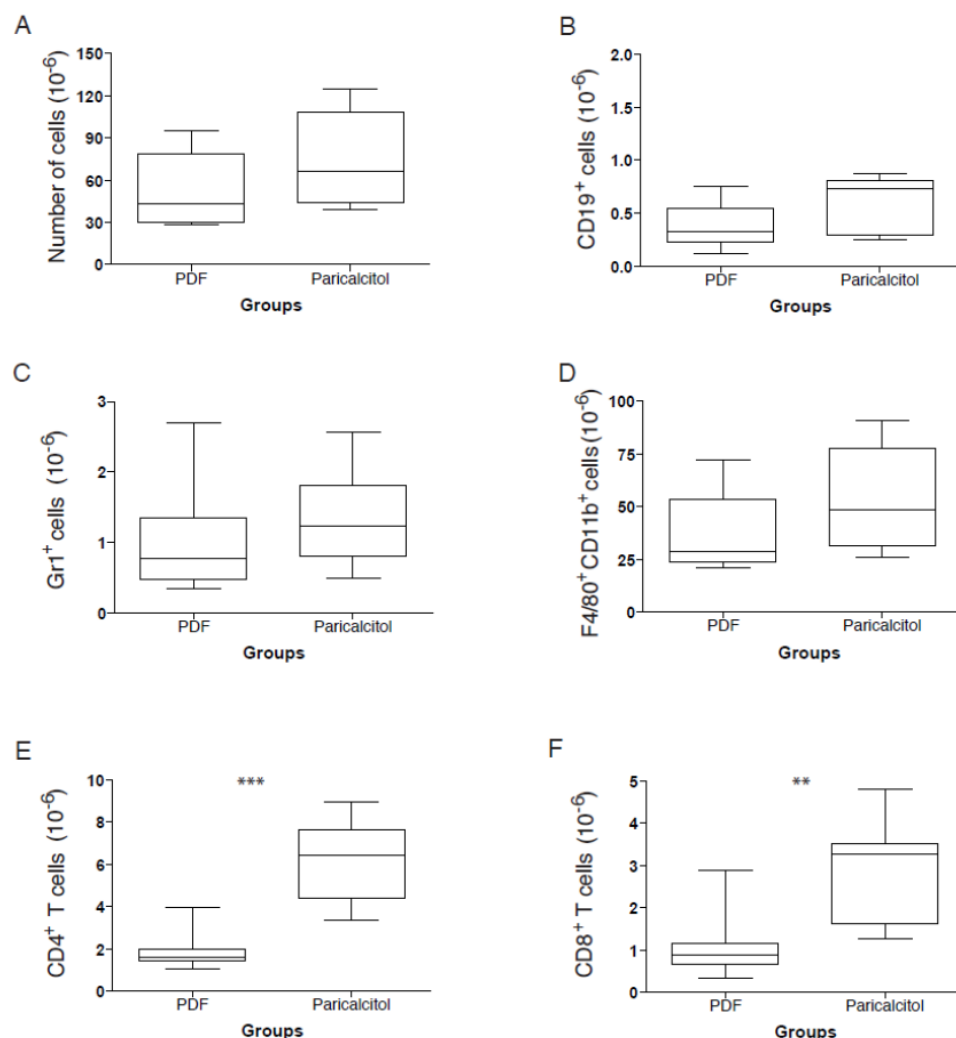
*Figure 1.* Paricalcitol<sup>®</sup> reduces peritoneal membrane fibrosis, inflammation and ultrafiltration failure in mice exposed to PDF. A, paraffin sections of peritoneal of three groups were stained with Masson's trichrome. B, thickening of peritoneal membrane was determined by morphometric analysis. C, Peritoneal permeability was determined by PET study. Box plots represent 75 % percentile, 25 % percentile, median, maximum and minimum values of five animals for control, 9 for PDF and 11 for Paricalcitol<sup>®</sup>. In D, the presence of inflammatory and mesothelial cells were determined by the expression of CD45 (green) and cytokeratin (red) in frozen section of peritoneal membrane representative of each group. E, the presence of endothelial and mesothelial cells were determined by the expression of CD31 (green) and cytokeratin (red) in frozen section of peritoneal membrane representative of each group. \*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

Peritoneal membrane chronically exposed to PDF suffers functional alterations known as ultrafiltration failure. In order to analyze the effect of Paricalcitol® on the functional alteration of peritoneal membrane we perform a peritoneal equilibrium test study. As shown in Figure 1C, the chronic exposure of peritoneal membrane to PDF leads to ultrafiltration failure. However, compared to PDF group, Paricalcitol group showed a better ultrafiltration (Figure 1C,  $p < 0.05$ ). Ultrafiltration failure could be the result of increased inflammation and angiogenesis. The evidences presented in the Figure 1A suggest that Paricalcitol® reduces PDF-induced inflammation of peritoneal membrane. In the Figure 1D, we showed an immunofluorescence of peritoneal membrane biopsy where we stain with anti-CD45 antibody (green), a marker of hematopoietic cells, and with anti-cytokeratin antibody (red) a mesothelial cell marker (Figure 1D). In control group, we appreciate few sporadic CD45<sup>+</sup> cells at peritoneal membrane, while in the PDF group, those cells are found above and below the mesothelial cell layer that was not well preserved. At Paricalcitol group, we observed a higher number of mesothelial cells and a reduced number of hematopoietic cells attached to peritoneal membrane when compared to mice of PDF group (Figure 1D). In order to determine the angiogenesis, we stained endothelial cells with anti-CD31 antibody (green) and mesothelial cells with an anti-cytokeratin antibody (red) in (Figure 1E). At control group, blood vessels were present in low frequency at distributed at muscular package (Figure 1E). We observed an increased numbers of blood vessels at muscular package, at the base of peritoneal membrane and imbedded at inflammatory zone of the peritoneal membrane in mice from PDF compared to control group. Paricalcitol group presents higher number of blood vessels at muscular package than control group. However, it presents lower number of blood vessels at the base of peritoneal membrane as compared to PDF group, and no blood vessel imbedded in inflammatory zone. This demonstrates that Paricalcitol® group has lower peritoneal membrane inflammation and lower blood vessels number that could explain the difference in ultrafiltration with the PDF group. Together, the results demonstrated that Paricalcitol® prevented fibrosis and ultrafiltration failure through the reduction of inflammation and angiogenesis at peritoneal membrane.

#### *The effect of Paricalcitol on peritoneal cavity inflammation*

Peritoneal membrane PDF-exposure induces migration of inflammatory cells to peritoneal cavity. These cells obtained by peritoneal washed are representative of an inflammatory process, and could be used to study its role in peritoneal deterioration. Therefore, in order to better understand the effect of Paricalcitol® treatment, we study the cell population present at peritoneal cavity of PDF and Paricalcitol group. The results demonstrate that Paricalcitol group has higher number of peritoneal nucleated cells compared to PDF instillation alone ( $p < 0.05$ ) (Figure 2A). To seek differences in the peritoneal cell infiltrate between PDF and Paricalcitol group, we analyzed different populations of immunological cell using flow cytometry. The number of peritoneal B cells (CD19<sup>+</sup>) (Figure 2B) and macrophages (CD11b<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup>) (Figure

2D) was not different between PDF and Paricalcitol group. In contrast, Paricalcitol group had higher numbers granulocytes ( $\text{Gr1}^+ \text{F4/80}^-$ ) ( $p < 0.01$ ),  $\text{CD4}^+$  ( $p < 0.01$ ) and  $\text{CD8}^+$  ( $p < 0.001$ ) T cells than PDF group (Figure 2C, 2E and 2F, respectively).



*Figure 2.* Paricalcitol<sup>®</sup> influenced cell population at peritoneal cavity. A, Paricalcitol<sup>®</sup> induced increasing number of nucleated cells at peritoneal cavity ( $p < 0.05$ ). It did not affect quantitatively B cell ( $\text{CD19}^+$ ) population (B) or macrophages ( $\text{CD11b}^+ \text{F4/80}^+$ )(C). Paricalcitol<sup>®</sup> increased the number of granulocytes ( $\text{Gr1}^+ \text{F4/80}^-$ ) ( $p < 0.01$ ),  $\text{CD4}^+$  T cells ( $p < 0.01$ ) and  $\text{CD8}^+$  T cells ( $p < 0.001$ ).  $\text{CD8}^+$ , but not  $\text{CD4}^+$  T cell population from Paricalcitol<sup>®</sup> group tend to increased the frequency of cells expressing CTLA-4 (G, left). Paricalcitol<sup>®</sup> increases the frequency of  $\text{CD8}^+$  T cells expressing membrane TGF- $\beta$  without affecting its expression in  $\text{CD4}^+$  T cells (G right). PDF-group,  $n = 9$  ; Paricalcitol group,  $n = 11$ .

We found no statistical difference in the percentages of  $\text{CD25}^{\text{high}}$  cells between both groups of treatment (Figure 3A). However, it was early demonstrated that activation of VDR increased the frequency of regulatory T cells. Therefore, we analyzed the expression of CTLA-4 and membrane TGF- $\beta$ , two Treg markers (9, 10), on peritoneal  $\text{CD4}^+$  and  $\text{CD8}^+$  T cells of both



groups. The frequency of CD4<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4<sup>+</sup> (Figure 3B left) and membrane TGF- $\beta$  (Figure 3C left) was also similar in both groups. The frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4 tends to be higher in Paricalcitol than in PDF group. In addition, the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing membrane TGF- $\beta$  was significantly higher in Paricalcitol than in PDF group ( $p < 0.05$ ). This strongly suggests that Paricalcitol treatment increases the frequency of CD8<sup>+</sup> regulatory T cells at peritoneal cavity.

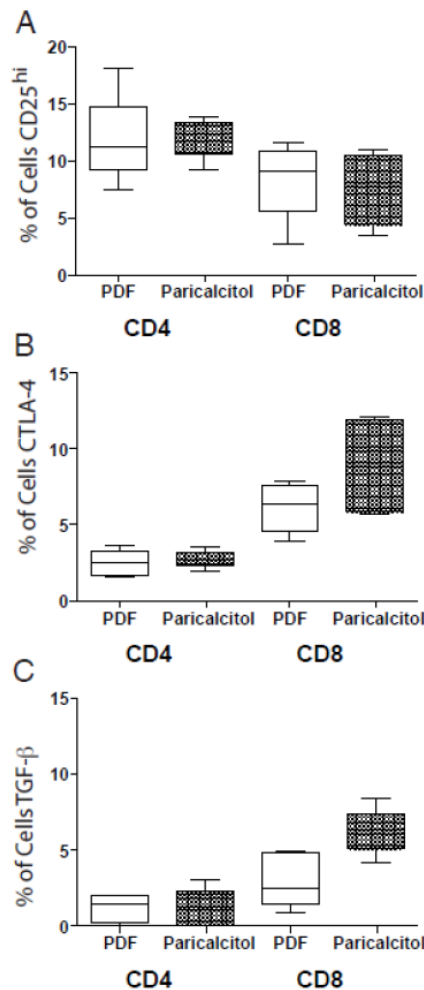


Figure 3. The frequency of CD25<sup>high</sup> cells did not vary between treatments (A). The frequency of CD4<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4<sup>+</sup> (B left) and membrane TGF- $\beta$  (C left) was also similar in both groups. The frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4 tends to be higher in Paricalcitol than in PDF group (B right). In addition, the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing membrane TGF- $\beta$  was significantly higher in Paricalcitol than in PDF group ( $p < 0.05$ ) (C right).

*Paricalcitol did not affect chemokine production at peritoneal cavity.*

Members of the chemokine superfamily are crucially involved in inflammation responsible for both innate and adaptive immune responses. They were recognized for their effects on cell activation, differentiation, and trafficking (11). Therefore, we pursue the effect of Paricalcitol on chemokine production at peritoneal cavity of mice receiving PDF instillation (Figure 4). Compared to PDF group, Paricalcitol group shows similar levels of MCP-1 (Figure 4A), MCP-3 (Figure 4B), MIP-1 $\alpha$  (Figure 4D), MIP-1 $\beta$  (Figure 4E) and RANTES (Figure 4F). However, the level of peritoneal GM-CSF was higher in PDF than Paricalcitol group ( $p < 0.05$ ) (Figure 4C).



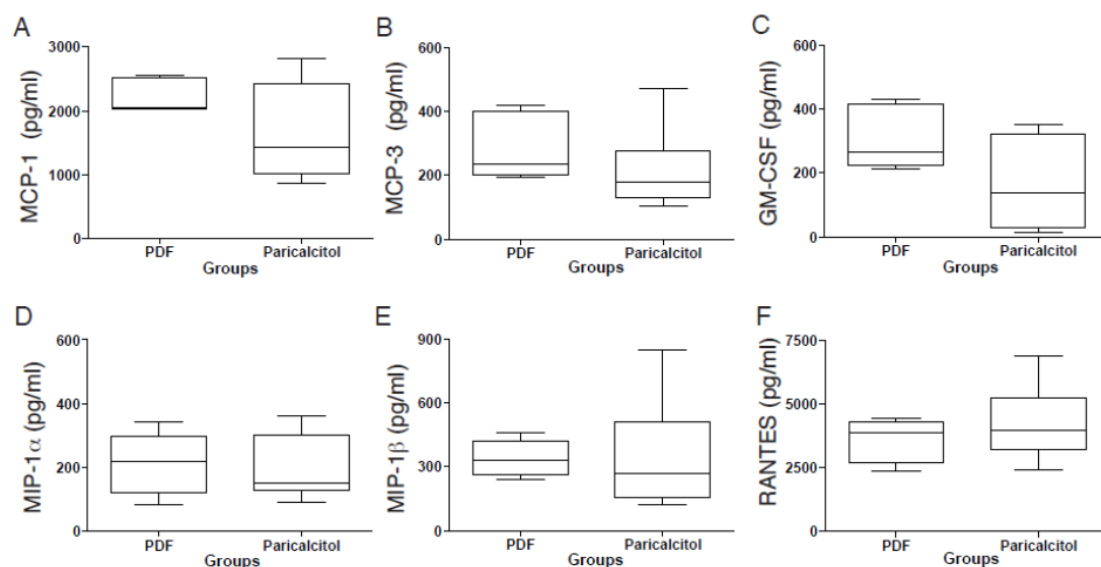


Figure 4. Chemokine concentrations at peritoneal cavity were affected by Paricalcitol<sup>®</sup> treatment. The concentration of MCP-1 (A), MCP-3 (B), GM-CSF (C), MIP-1 $\alpha$  (D), MIP-1 $\beta$  (E) and RANTES (F) determined at peritoneal lavage were not different between Paricalcitol<sup>®</sup> and PDF group. PDF group, n= 5 ; Paricalcitol group, n=7.

#### *Paricalcitol treatment reduces selectively IL-17 at peritoneal cavity*

Inflammatory cytokines are directly involved in tissue repair presenting fibrogenic and anti-fibrogenic activity (12-14). To determine if Paricalcitol affects the concentration of PDF-induced fibrogenic cytokines at peritoneal cavity, we perform the analysis of their concentration at peritoneal washed. Despite the increased numbers of cells in mice treated with Paricalcitol<sup>®</sup>, we observed no difference between Paricalcitol and PDF group in the peritoneal concentrations of IL-1 $\alpha$  (Figure 5A), IL-2 (Figure 5B), IL-4 (Figure 5C), IL-5 (Figure 5D), IL-10 (Figure 5E), IFN- $\gamma$  (Figure 5F), TNF- $\alpha$  (Figure 5G), IL-6 (Figure 5H) and TGF- $\beta$  (Figure 5I). However, PDF group presents significantly higher level of IL-17 than Paricalcitol group ( $p < 0.001$ ) (Figure 5J).

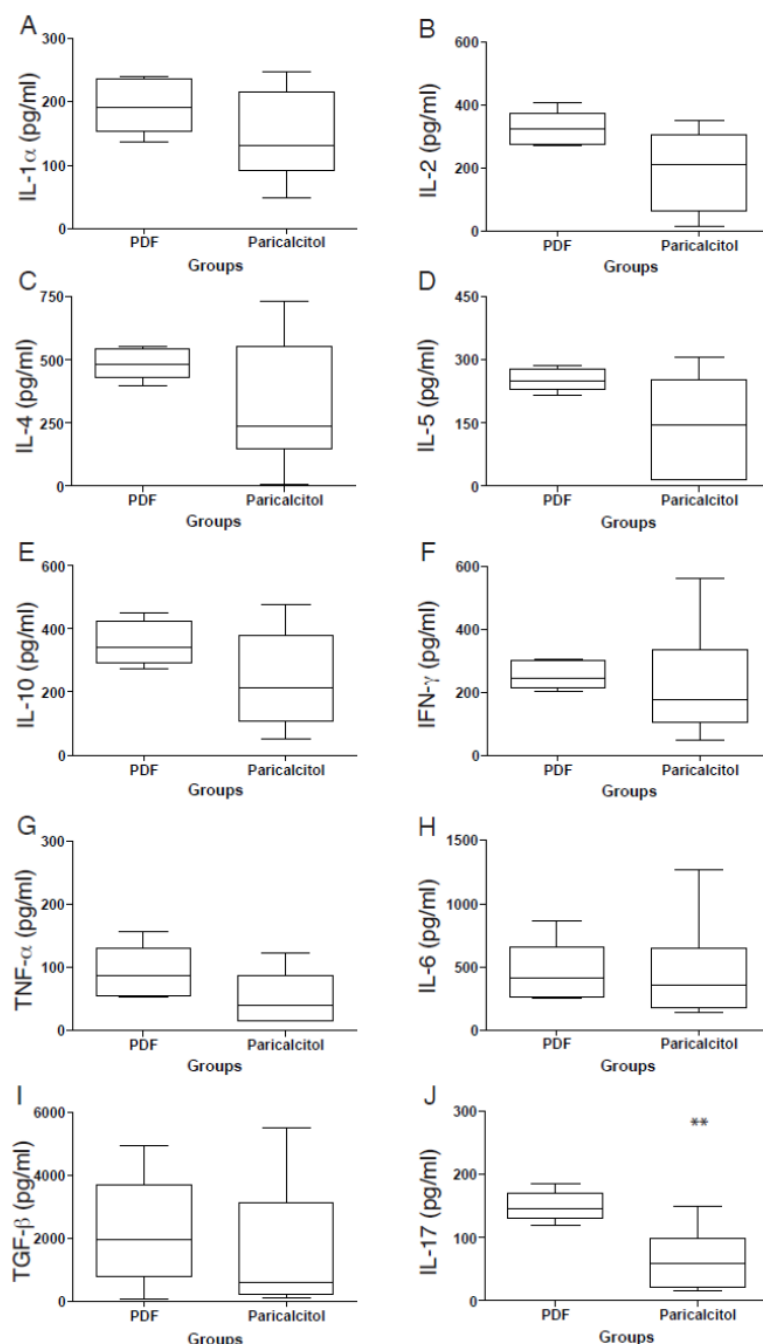


Figure 5. Paricalcitol<sup>®</sup> treatment reduced IL-17 production induced by peritoneal membrane exposure to PDF. The concentration of IL-1 $\alpha$  (A), IL-2 (B), IL-4 (C), IL-5 (D), IL-10 (E), IFN- $\gamma$  (F), TNF- $\alpha$  (G), IL-6 (H), TGF- $\beta$  (I) and IL-17 (J) were determined at peritoneal lavage. In general, cytokines concentrations tend to be reduced at peritoneal cavity of mice treated with Paricalcitol<sup>®</sup> but did not reach statistical differences, except for IL-17, that was lower in peritoneal washed of Paricalcitol<sup>®</sup> than in PDF group (p<0,001).

We have early observed that IL-17 was induced by the exposure to PDF and that its concentration is directly correlated with peritoneal membrane thickening (Rodriguez-Díez *et al*,

submitted for publication). Therefore, we analyzed the correlation between IL-17 peritoneal concentration and peritoneal membrane thickening in both groups. The result presented in Figure 6C clearly confirms that IL-17 play an important role in peritoneal fibrosis induced by PDF exposure and that Paricalcitol® reduces IL-17 and peritoneal fibrosis. Moreover, CD4+ (Figure 6A) and CD8+ (Figure 6B) T cell numbers inversely correlates with the thickness of the peritoneal membrane.

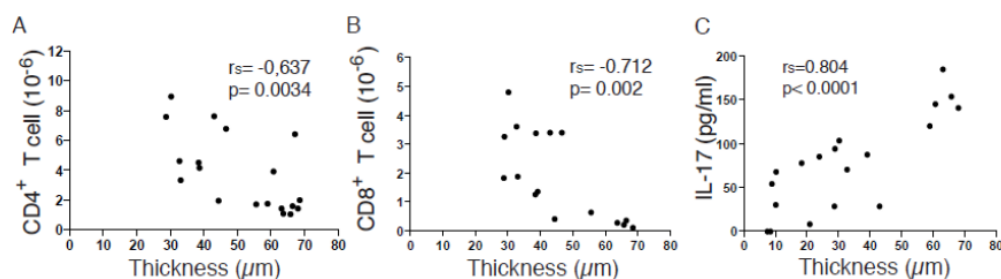


Figure 6. CD4+ (A) and CD8+ (B) T cell numbers inversely correlates with the thickness of the peritoneal membrane, while IL-17 peritoneal concentration strongly correlates with peritoneal membrane thickening (C).

### Discussion:

Fibrosis is the final consequence of a chronic inflammatory reaction (1, 13, 14). Wherefore, the regulation of inflammatory reaction may have a beneficial effect on the fibrotic disorders. VDR signaling has previously shown to possess an immunomodulatory (15-19) and fibroprotective activity in different organs (20-24) and Zang, Y (doi: 10.1681/ASN.2009080872). Different mechanisms have been proposed to explain the role of VDR signaling in fibrosis prevention, but it is still poorly understood. Some evidences suggest that it prevents epithelial-to-mesenchymal transition (25), inhibits myofibroblast activation (24), differentiates mesenchymal precursors into a non-fibrogenic phenotype (26) or reduces inflammation through NF- $\kappa$ B sequestration (27). These mechanisms are not mutually exclusive and may work together.

In the present study, we clearly demonstrate that Paricalcitol<sup>®</sup> administered at peritoneal cavity prevents peritoneal membrane fibrosis induced by chronically exposure to PDF (Figure 1A and B). In addition, Paricalcitol<sup>®</sup> also prevents the angiogenesis at peritoneal membrane that characterizes the granular tissue (Figure 1E), positively affecting the peritoneal ultrafiltration (Figure 1C).

We observed a reduction of hematopoietic cells (CD45<sup>+</sup> cells) infiltrating peritoneal membrane of mice treated with Paricalcitol<sup>®</sup> (Figure 1D). This demonstrates that Paricalcitol<sup>®</sup> treatment had an immunomodulatory action at peritoneal membrane inflammation, probably affecting migration or adhesion of inflammatory cells to the peritoneal membrane. This demonstrates that fibrosis prevention was, at least in part, a consequence of inflammatory modulation of peritoneal membrane induced by Paricalcitol<sup>®</sup>. However, contrasting with lower number of inflammatory cells attached to peritoneal membrane, we observed that Paricalcitol<sup>®</sup> treated mice have higher number of cells at peritoneal cavity compared to PDF group. This suggests that Paricalcitol<sup>®</sup> reduces adhesion of inflammatory cells to peritoneal membrane leading to their accumulation at peritoneal cavity.

Since PDF instillation is an inflammatory stimulus given at peritoneal cavity, inflammatory cells driven to peritoneal cavity are representative of cells involved in peritoneal damage. In order to better understand the differences between Paricalcitol<sup>®</sup> and PDF group, we analyzed the cell population at peritoneal cavity of both groups. Paricalcitol<sup>®</sup> treatment did not affect the numbers of B cells (Figure 2B) or macrophages (Figure 2D) in comparison with PDF group. However, it increased number of granulocytes (Figure 2C), CD4<sup>+</sup> (Figure 2E) and CD8<sup>+</sup> (Figure 2F) T cells. VDR activation has been related with the increasing frequency of regulatory T cell and, therefore, we analyzed the frequency of T cells expressing Treg phenotype in both groups. Paricalcitol<sup>®</sup> treatment did not affect the frequency of CD4<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4 or membrane TGF- $\beta$  compared to PDF group. However, Paricalcitol<sup>®</sup> treatment tends to increase the frequency of peritoneal CD8<sup>+</sup> T cells expressing CTLA-4 (Figure 2G left). In addition, Paricalcitol<sup>®</sup> significantly increases the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing membrane TGF- $\beta$

compared to cells from PDF group (Figure 2G right). These suggest that, at least in our model, Paricalcitol® preferentially activated regulatory CD8<sup>+</sup> T cells. This selective effect on CD8<sup>+</sup> T cells could be explained by the fact that mature CD8<sup>+</sup> T cells express higher concentration of VDR than CD4<sup>+</sup> T cells (28). Therefore, the results presented in this manuscript demonstrate for the first time that VDR signaling could preferentially activate or differentiate CD8<sup>+</sup> T cells into regulatory phenotype and that these cells may be involved in the regulation of peritoneal membrane activation.

The existence of CD8<sup>+</sup> “suppressor” T cells was early demonstrated during 1970s and 1980s. However, the study of these cells was frustrated by technical limitations. Nowadays, the CD8<sup>+</sup> suppressor T cells were resurrected and increasing evidences suggests their participation in the control of different inflammatory process (29-31). There are many subsets of regulatory CD8<sup>+</sup> T cells that produce a suppressor effect in a contact dependent manner via CTLA-4 and TGF- $\beta$  (32). In collagen induced arthritis model, CD8<sup>+</sup> regulatory, but not CD4<sup>+</sup> regulatory T cells, are able to suppress IL-17 and IFN- $\gamma$  production as well as proliferation by antigen specific CD4<sup>+</sup> T cells (33). Moreover, the presence of CD8<sup>+</sup> regulatory T cells with the ability to suppress IL-17, IFN- $\gamma$  and proliferation of myelin antigen-specific CD4<sup>+</sup> T at cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis was recently demonstrated. The frequency of these cells is reduced during disease exacerbation and present normal frequency during remission phase (34).

There are many evidences demonstrating that VDR signaling stimulate the differentiation of T cells into regulatory phenotype and function (9, 35-37). Regulatory T cells play important role in regulating Th1, Th17 and Th2 cytokines. Some works suggest that vitamin D acts on antigen presenting cells, mainly dendritic cells, differentiating then into tolerogenic phenotype that promotes activation and recruitment of Treg into site of inflammation (35, 38). In addition, some evidences suggest that VDR signaling could expand the CD4<sup>+</sup> Treg cells (35) or enhance their suppressive activity (37). Despite the efforts to understand how VDR signaling preferentially activate regulatory T cells, the mechanism is still obscure.

Inflammatory cytokines play important role in the progression of fibrosis activating and sustaining fibroblasts. It was previously demonstrated that VDR signaling inhibit Th1 (39, 40) and Th17 (27, 41) pathways reducing inflammation. The effect of VDR signaling on Th2 pathways is still not clear (42, 43). In our experiment, we observed a reduction of IL-17 and a tendency to reduce other cytokines related with fibro-proliferative disorders (Figure 4). Th17 T cells have been early associated with different models and human immunological disease (44-46), suggesting an important role for this type of response in autoimmune pathologies. More recently, an increasing numbers of evidences correlate IL-17 with fibro-proliferative disorders caused by infection (47), autoimmunity (48), drug (49), chronic rejection (50), kidney obstruction (51) and keloid formation in susceptible persons (52). Together, these data demonstrate demonstrates that IL-17 plays a important pro-fibrotic role in different model. We



have recently demonstrated that PDF exposure induces IL-17 production at peritoneal membrane and that it plays an important role in peritoneal fibrosis (Rodriguez-Díez R et al submitted for publication). In addition, we demonstrate in this manuscript that Paricalcitol treatment selectively reduced IL-17 peritoneal concentration and that this effect on IL-17 strongly correlated with peritoneal fibrosis (Figure 4K). The mechanism involved in IL-17 down regulation is still unclear in our model. It was early demonstrate that VDR signaling may affect the production of inflammatory cytokines and can directly reduce the production of IL-17 by memory T cells (41). *In vitro*, it suppressed IL-17 induction in purified CD4<sup>+</sup> T cells without inhibiting ROR $\gamma$ t, STAT3, nor FoxP3 expression. However, *in vivo*, it could impair the commitment to the Th17 lineage defined by the reduction of both ROR $\gamma$ t and IL-17 in CD4<sup>+</sup> T cells (16). IL-17 secreting cells and Treg appear to have a common precursor that, in the presence of VDR signaling could stimulate the differentiation to Treg phenotype.

In conclusion, the PDF-induced inflammation of peritoneal membrane that culminates in fibrosis and ultrafiltration failure could be prevented by peritoneal co-treatment with Paricalcitol®. The results strongly suggest that the beneficial effect is a consequence of selective impairment on IL-17 production. In addition, the results also suggest that Paricalcitol® treatment increased the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing Treg phenotype and that these cells could be playing a role IL-17 regulation.

## Material and methods

### *Mice.*

This study was performed in non-uremic C57BL/6J female mice of 12-14 weeks of age purchased from Charles River Laboratories and maintained at conventional conditions in our animal facilities. All the experiments were approved by the Animal Care Committee of the Unidad de Cirugía Experimental, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

### *Surgery and PDF exposure*

Customized access port (Pennyport) (*Access Technologies, USA*) was implanted into the animals one week before the beginning of the treatment, as previously describe (53). Briefly, animals were anaesthetized and the end of catheters dwelled at peritoneal cavity and the ports were placed subcutaneously at the back of the mouse. Mice were subdivided into three groups: PDF group that was treated daily with Stay Safe (lactate and 4.25% glucose, from *Fresenius Medical Care, Germany*); Paricalcitol<sup>®</sup> group that was daily treated with Stay Safe plus Paricalcitol<sup>®</sup> (0.3 µg/kg/week) and a third group, age matched, with catheter, used as control.

### *Histological analyses.*

We collected tissue from parietal peritoneum, fixed them into Bouin solution, embedded in paraffin and cut into 5 µm sections. The sections were stained with Masson's trichrome to analyze fibrosis, and the sub-mesothelial layer thickness determined at microscope (*Leika CTR6000, with a Leika Microsystems LAS-AF6000*).

For the immunofluorescence analysis samples were frozen in OCT and cut into 3 µm sections. To identify mesothelial cells we used mouse anti-cytokeratin 8/18 (clone 5D3 Novocastra, Newcastle, UK) that was stained with anti-IgG1 specific Zenon<sup>®</sup> fab (Invitrogen, Eugene, USA) according to manufacture's instructions. Fibroblast was stained rabbit anti-FSP1 (S100-A4, DAKO, Glostrup, Demark) reveled with donkey anti-Rabbit IgG (Invitrogen). CD45+ Cells were identified using a rat anti-mouse CD45 (BD Bioscience) and stained with goat anti-rat antibody. Nuclei were stained with DAPI. Micrography was performed in fluorescence microscope (*Leika CTR6000, with a Leika Microsystems LAS-AF6000*).

### *Flow Cytometry analyses*

The following antibodies used for FACS analysis were purchased from BD Biosciences: PE anti mouse CD11b; APC rat anti- mouse Gr-1; PE anti-mouse CD4; biotin anti-mouse CD3e; FITC rat anti-mouse CD25; FITC rat anti-mouse CD19; Alexa Fluor 488 labeled anti-mouse CD8a and biotin anti-TGF-β.

PE-Cy7 conjugated anti- mouse F4/80 (Clone BM8) and biotin conjugated anti-mouse CD 152 (CTLA4) were from eBioscience (San Diego, USA).

Flow cytometry analysis was conducted on a FACSCalibur (BD Biosciences) with Cell Quest Pro software.

*Chemokines and cytokines assays*

For determination of peritoneal production of cytokines and chemokines peritoneal cavity was washed with two ml of saline immediately after mice scarify, centrifuged and supernatant separated in small aliquots and stored at -80°C. The peritoneal chemokines and cytokines were determined using flowcytomix technique (Bender MedSystems GmbH, Vienna, Austria).

*Statistical analyses.*

Data were analyzed with *GraphPad Prism version 4* software. Comparison between two groups was made with nonparametric Mann-Whitney *U* test and the comparison of three groups was performed with 1-way ANOVA followed by Dunn's multiple comparison test when significant.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**References:**

1. Darby, I.A., and Hewitson, T.D. 2007. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Int Rev Cytol* 257:143-179.
2. Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M.S., Brem, H., and Tomic-Canic, M. 2008. Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair Regen* 16:585-601.
3. Stramer, B.M., Mori, R., and Martin, P. 2007. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. *J Invest Dermatol* 127:1009-1017.
4. Le Bousse-Kerdiles, M.C., Martyre, M.C., and Samson, M. 2008. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. *Eur Cytokine Netw* 19:69-80.
5. Reish, R.G., and Eriksson, E. 2008. Scars: a review of emerging and currently available therapies. *Plast Reconstr Surg* 122:1068-1078.
6. Krediet, R.T. 1999. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* 55:341-356.
7. Bikle, D.D. 2009. Vitamin D and immune function: understanding common pathways. *Curr Osteoporos Rep* 7:58-63.
8. Lemire, J.M. 1992. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Cell Biochem* 49:26-31.
9. Jeffery, L.E., Burke, F., Mura, M., Zheng, Y., Qureshi, O.S., Hewison, M., Walker, L.S., Lammas, D.A., Raza, K., and Sansom, D.M. 2009. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* 183:5458-5467.
10. Oida, T., Xu, L., Weiner, H.L., Kitani, A., and Strober, W. 2006. TGF-beta-mediated suppression by CD4+CD25+ T cells is facilitated by CTLA-4 signaling. *J Immunol* 177:2331-2339.
11. Adams, D.H., and Lloyd, A.R. 1997. Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet* 349:490-495.
12. Cheong, Y.C., Laird, S.M., Li, T.C., Shelton, J.B., Ledger, W.L., and Cooke, I.D. 2001. Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Hum Reprod Update* 7:556-566.
13. Marra, F., Aleffi, S., Galastri, S., and Provenzano, A. 2009. Mononuclear cells in liver fibrosis. *Semin Immunopathol* 31:345-358.
14. Wynn, T.A. 2008. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214:199-210.
15. Froicu, M., and Cantorna, M.T. 2007. Vitamin D and the vitamin D receptor are critical for control of the innate immune response to colonic injury. *BMC Immunol* 8:5.
16. Tang, J., Zhou, R., Luger, D., Zhu, W., Silver, P.B., Grajewski, R.S., Su, S.B., Chan, C.C., Adorini, L., and Caspi, R.R. 2009. Calcitriol suppresses antiretinal autoimmunity through inhibitory effects on the Th17 effector response. *J Immunol* 182:4624-4632.
17. Meehan, T.F., and DeLuca, H.F. 2002. The vitamin D receptor is necessary for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Arch Biochem Biophys* 408:200-204.
18. Fukazawa, T., Yabe, I., Kikuchi, S., Sasaki, H., Hamada, T., Miyasaka, K., and Tashiro, K. 1999. Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *J Neurol Sci* 166:47-52.
19. Lemire, J.M., and Adams, J.S. 1992. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the passive transfer of cellular immunity by a myelin basic protein-specific T cell clone. *J Bone Miner Res* 7:171-177.
20. Balkan, C., Ersoy, B., and Nese, N. 2005. Myelofibrosis associated with severe vitamin D deficiency rickets. *J Int Med Res* 33:356-359.
21. Gilbert, C.R., Arum, S.M., and Smith, C.M. 2009. Vitamin D deficiency and chronic lung disease. *Can Respir J* 16:75-80.



22. Cooke, G.L., Chien, A., Brodsky, A., and Lee, R.C. 2005. Incidence of hypertrophic scars among African Americans linked to vitamin D-3 metabolism? *J Natl Med Assoc* 97:1004-1009.
23. Koleganova, N., Piecha, G., Ritz, E., and Gross, M.L. 2009. Calcitriol ameliorates capillary deficit and fibrosis of the heart in subtotaly nephrectomized rats. *Nephrol Dial Transplant* 24:778-787.
24. Li, Y., Spataro, B.C., Yang, J., Dai, C., and Liu, Y. 2005. 1,25-dihydroxyvitamin D inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression. *Kidney Int* 68:1500-1510.
25. Tan, X., Li, Y., and Liu, Y. 2006. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 17:3382-3393.
26. Artaza, J.N., and Norris, K.C. 2009. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J Endocrinol* 200:207-221.
27. Tan, X., Wen, X., and Liu, Y. 2008. Paricalcitol inhibits renal inflammation by promoting vitamin D receptor-mediated sequestration of NF-kappaB signaling. *J Am Soc Nephrol* 19:1741-1752.
28. Deluca, H.F., and Cantorna, M.T. 2001. Vitamin D: its role and uses in immunology. *Faseb J* 15:2579-2585.
29. Pomie, C., Menager-Marcq, I., and van Meerwijk, J.P. 2008. Murine CD8+ regulatory T lymphocytes: the new era. *Hum Immunol* 69:708-714.
30. Kapp, J.A., and Bucy, R.P. 2008. CD8+ suppressor T cells resurrected. *Hum Immunol* 69:715-720.
31. Lu, L., and Cantor, H. 2008. Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cell Mol Immunol* 5:401-406.
32. Konya, C., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. 2009. Treating autoimmune disease by targeting CD8(+) T suppressor cells. *Expert Opin Biol Ther* 9:951-965.
33. Notley, C.A., McCann, F.E., Inglis, J.J., and Williams, R.O. ANTI-CD3 therapy expands the numbers of CD4+ and CD8+ Treg cells and induces sustained amelioration of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 62:171-178.
34. Correale, J., and Villa, A. Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 67:625-638.
35. Ardalan, M.R., Maljaei, H., Shoja, M.M., Piri, A.R., Khosroshahi, H.T., Noshad, H., and Argani, H. 2007. Calcitriol started in the donor, expands the population of CD4+CD25+ T cells in renal transplant recipients. *Transplant Proc* 39:951-953.
36. Daniel, C., Sartory, N.A., Zahn, N., Radeke, H.H., and Stein, J.M. 2008. Immune modulatory treatment of trinitrobenzene sulfonic acid colitis with calcitriol is associated with a change of a T helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and regulatory T cell profile. *J Pharmacol Exp Ther* 324:23-33.
37. Gorman, S., Kuritzky, L.A., Judge, M.A., Dixon, K.M., McGlade, J.P., Mason, R.S., Finlay-Jones, J.J., and Hart, P.H. 2007. Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity of CD4+CD25+ cells in the draining lymph nodes. *J Immunol* 179:6273-6283.
38. Adorini, L., and Penna, G. 2009. Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists. *Hum Immunol* 70:345-352.
39. van Halteren, A.G., van Etten, E., de Jong, E.C., Bouillon, R., Roep, B.O., and Mathieu, C. 2002. Redirection of human autoreactive T-cells Upon interaction with dendritic cells modulated by TX527, an analog of 1,25 dihydroxyvitamin D(3). *Diabetes* 51:2119-2125.
40. Ma, Y., Khalifa, B., Yee, Y.K., Lu, J., Memezawa, A., Savkur, R.S., Yamamoto, Y., Chintalacharuvu, S.R., Yamaoka, K., Stayrook, K.R., et al. 2006. Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *J Clin Invest* 116:892-904.
41. Colin, E.M., Asmawidjaja, P.S., van Hamburg, J.P., Mus, A.M., van Driel, M., Hazes, J.M., van Leeuwen, J.P., and Lubberts, E. 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17

- polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 62:132-142.
42. Boonstra, A., Barrat, F.J., Crain, C., Heath, V.L., Savelkoul, H.F., and O'Garra, A. 2001. 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 167:4974-4980.
43. Staeva-Vieira, T.P., and Freedman, L.P. 2002. 1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells. *J Immunol* 168:1181-1189.
44. Segal, B.M. Th17 cells in autoimmune demyelinating disease. *Semin Immunopathol* 32:71-77.
45. Gaffen, S.L. 2009. The role of interleukin-17 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 11:365-370.
46. Kramer, J.M., and Gaffen, S.L. 2007. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity, and therapy. *J Periodontol* 78:1083-1093.
47. Simonian, P.L., Roark, C.L., Wehrmann, F., Lanham, A.K., Diaz del Valle, F., Born, W.K., O'Brien, R.L., and Fontenot, A.P. 2009. Th17-polarized immune response in a murine model of hypersensitivity pneumonitis and lung fibrosis. *J Immunol* 182:657-665.
48. Daniels, M.D., Hyland, K.V., Wang, K., and Engman, D.M. 2008. Recombinant cardiac myosin fragment induces experimental autoimmune myocarditis via activation of Th1 and Th17 immunity. *Autoimmunity* 41:490-499.
49. Wilson, M.S., Madala, S.K., Ramalingam, T.R., Gochuico, B.R., Rosas, I.O., Cheever, A.W., and Wynn, T.A. Bleomycin and IL-1beta-mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med* 207:535-552.
50. Faust, S.M., Lu, G., Marini, B.L., Zou, W., Gordon, D., Iwakura, Y., Laouar, Y., and Bishop, D.K. 2009. Role of T cell TGFbeta signaling and IL-17 in allograft acceptance and fibrosis associated with chronic rejection. *J Immunol* 183:7297-7306.
51. Dong, X., Bachman, L.A., Miller, M.N., Nath, K.A., and Griffin, M.D. 2008. Dendritic cells facilitate accumulation of IL-17 T cells in the kidney following acute renal obstruction. *Kidney Int* 74:1294-1309.
52. Zhang, Q., Yamaza, T., Kelly, A.P., Shi, S., Wang, S., Brown, J., Wang, L., French, S.W., and Le, A.D. 2009. Tumor-like stem cells derived from human keloid are governed by the inflammatory niche driven by IL-17/IL-6 axis. *PLoS One* 4:e7798.
53. Gonzalez-Mateo, G.T., Loureiro, J., Jimenez-Hefferman, J.A., Bajo, M.A., Selgas, R., Lopez-Cabrera, M., and Aroeira, L.S. 2009. Chronic exposure of mouse peritoneum to peritoneal dialysis fluid: structural and functional alterations of the peritoneal membrane. *Perit Dial Int* 29:227-230.

## V. DISCUSIÓN





La hipótesis que ha llevado al desarrollo de esta tesis es que la presencia de una inflamación crónica generada por la exposición a los líquidos utilizados en DP promueve la aparición de fibrosis peritoneal. Para estudiar esta hipótesis fue necesario el desarrollo de un nuevo modelo experimental. Pese a la existencia previa de otros modelos semejantes en distintos tipos de animales de experimentación (oveja<sup>152</sup>, conejo<sup>153</sup> o rata<sup>154</sup>), la decisión de trabajar en el desarrollo del modelo en ratón obedece al reconocimiento de las múltiples ventajas adicionales que puede ofrecer. Entre estas ventajas, destacan la posibilidad de utilizar ratones modificados genéticamente para estudiar las bases moleculares y celulares del daño peritoneal, el menor tiempo de tratamiento necesario para observar las alteraciones morfofuncionales en el peritoneo, u otras ventajas secundarias pero no menospreciables, como son la disponibilidad de reactivos, el coste de los experimentos (más económicos al tratarse de animales más pequeños), el espacio requerido para su estabulación, y la facilidad de manejo de estos animales. Además, existe mayor cantidad de información disponible sobre las diferentes cepas de ratones que sobre otras muchas especies, ya que éstos han sido los animales más comúnmente empleados en investigación.

Los estudios en ratones realizados por otros grupos en este campo son en su mayoría modelos de exposición aguda, de horas o pocos días, que no permiten el análisis de los daños producidos a tiempos prolongados<sup>155-157</sup>. Otros trabajos a tiempos más largos inoculan el LD mediante inyección intraperitoneal con agujas<sup>80</sup>. La utilización de agujas de forma reiterada supone un riesgo mayor de infecciones y sangrado, e incluso la posibilidad de lesionar algún órgano o tejido. Por esto, nosotros quisimos utilizar un catéter permanente para la instilación crónica de LD. Además, de este modo el modelo experimental se asemeja con mayor fidelidad al tratamiento de DP en pacientes.

El dispositivo elegido en el desarrollo del modelo para la inoculación intraperitoneal del LD fue diseñado específicamente para reducir el riesgo de obturación de la luz del catéter, desprendimiento del mismo de la zona de inserción y laceración del tejido. Así, está compuesto de un puerto de acceso conectado a una cánula. Ésta, pese a tener un diámetro muy fino, posee perforaciones en su extremo que permiten la salida del líquido con mayor facilidad, y la longitud de la cánula que queda en el interior de la cavidad peritoneal es mínima. Además, tiene dos topes entre los que se ancla la musculatura peritoneal para evitar desplazamientos. Sin embargo, una limitación del modelo resultante de la utilización de un puerto de acceso subcutáneo es la imposibilidad de drenaje del LD. Por este motivo, el riñón de los animales debe permanecer funcional, lo que hace que éste sea un modelo de exposición de la membrana a LD, y no un modelo de DP en sí. No obstante, esto resulta ventajoso para este tipo de estudios puesto que la cavidad peritoneal no está siendo lavada constantemente, de modo que las células y los factores solubles presentes se encuentran en mayor concentración, acelerando el proceso del daño. En el caso de los pacientes de

DP, al estar más diluidos en el efluente, en muchas ocasiones estos factores no son detectados por los métodos empleados rutinariamente. Curiosamente, se ha observado que muchos pacientes desarrollan una esclerosis peritoneal encapsulante paulatina tras el cese del tratamiento<sup>158</sup>. Esto puede deberse a que las células y factores solubles que se encuentran en la cavidad peritoneal ya no están siendo lavadas y eliminadas, por lo que el proceso inflamatorio continúa desarrollándose y se favorece el desarrollo de fibrosis y como consecuencia última, esclerosis.

Existe por otra parte un debate abierto actualmente sobre la posible interferencia de la utilización de un catéter permanente para estos estudios. Sin embargo, nuestros resultados demuestran que la reacción frente a cuerpo extraño que dicho catéter provoca se remite única y exclusivamente a la zona de inserción del mismo, no afectando al estado general del peritoneo. De hecho, el peritoneo de los pacientes de DP está siempre sometido a la presencia del catéter. Por tanto, el empleo de este elemento es importante desde el punto de vista de la necesidad de asemejar el modelo con la realidad al máximo posible. Con el fin de evitar interferencias debidas al daño inducido por la presencia del catéter en el análisis, hemos evitado la toma de muestras de las zonas cercanas a éste. Así pues, todos los análisis morfológicos de la membrana peritoneal incluidos en esta tesis están realizados en muestras extraídas de la zona opuesta al catéter o zona contra-lateral.

Los resultados presentados en esta tesis indican que la membrana peritoneal de los ratones sufre alteraciones similares a la de los pacientes de DP en respuesta a la exposición crónica a LD, tanto a nivel morfológico como funcional. Así, observamos alteraciones en la capa mesotelial (EMT y desmesotelización), angiogénesis, engrosamiento y disminución de la capacidad de ultrafiltración. Esto significa que el modelo reproduce fielmente los procesos patológicos que se desarrollan en el peritoneo humano durante los tratamientos de DP. Por tanto, este modelo experimental en ratón puede resultar una herramienta muy útil y valiosa para el estudio del efecto sobre la membrana peritoneal de nuevos LD más biocompatibles, los mecanismos involucrados en el deterioro de la morfología y función peritoneal, así como la selección de nuevas terapias preventivas o de tratamiento.

Investigamos posteriormente qué factores promueven el desarrollo de la EMT, la angiogénesis, el fallo de UF y la fibrosis que hemos observado en el peritoneo expuesto a LD. Este conocimiento permitirá reducir la velocidad de aparición de estos fenómenos. Los estudios realizados hasta ahora se centraban en cada fenómeno de forma más o menos aislada, pero no mostraban una relación entre ellos. Los resultados de distintos trabajos sugieren la existencia de una inflamación crónica asociada a la DP. Estos trabajos hasta ahora publicados se refieren fundamentalmente a análisis a nivel sistémico<sup>159-161</sup>. Aquí demostramos, por primera vez de forma global, los cambios que se producen localmente en el peritoneo con respecto a la inflamación y su asociación con los fenómenos patológicos.

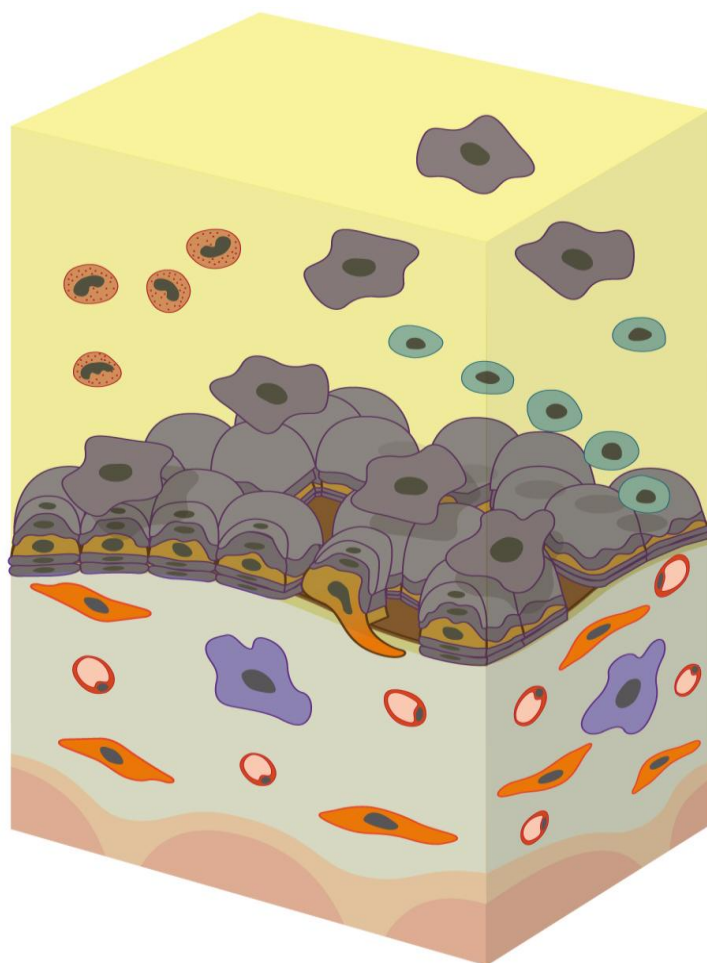
Esta inflamación es consecuencia de la exposición al LD, el cual genera un ambiente no fisiológico que supone un estímulo inflamatorio. Las células presentes en el peritoneo, tanto las residentes en el tejido como las que se encuentran en el espacio peritoneal, van a responder ante este estímulo. Distintos estudios *in vitro* han demostrado ya la capacidad de adipocitos<sup>162</sup>, fibroblastos<sup>163-164</sup>, macrófagos<sup>165</sup>, células endoteliales<sup>166</sup> o células mesoteliales<sup>167-170</sup> de producir distintas quimioquinas y citoquinas que estarían colaborando en la generación y mantenimiento del proceso inflamatorio.

La atracción y activación de células hematopoyéticas está mediada por quimioquinas. Así por ejemplo, MCP-1, MCP-3 y GM-CSF están implicadas en el reclutamiento de macrófagos<sup>114</sup>, mientras RANTES y MIP-1 $\alpha$  y  $\beta$  atraen células T<sup>122</sup>. En nuestro modelo, tras la exposición al LD todas estas quimioquinas se encuentran aumentadas. El análisis de las poblaciones celulares presentes en el lavado peritoneal demostró que se trata, en su gran mayoría, de células de origen hematopoyético. Observamos que la exposición crónica del peritoneo a LD genera a lo largo del tiempo una disminución de linfocitos B, mientras que los macrófagos y linfocitos T aumentan. Las células más abundantes en el peritoneo son los macrófagos. El aumento de estas poblaciones está relacionado con el incremento en la concentración de las quimioquinas anteriormente comentadas, y podría jugar un papel importante en la fibrosis peritoneal de acuerdo con resultados de estudios previos en otras patologías<sup>45,171-172</sup>. Así, podemos decir que el LD supone un estímulo para las células presentes en el peritoneo, las cuales van a secretar quimioquinas que atraen células inflamatorias.

Con respecto a la disminución de linfocitos B, podría deberse a una migración de estas células hacia el intestino o incluso también podrían sufrir una diferenciación hacia células con características de macrófagos, como se ha descrito en otros modelos<sup>173-175</sup>.

Observamos también un incremento de la celularidad en la MP a lo largo del tratamiento, que está relacionado con la aparición de fibrosis. Realizamos un triple marcaje para identificar si se trataba de mesoteliales, fibroblastos, o células de origen hematopoyético. Los resultados indican la presencia de algunas células mesoteliales expresando marcadores de fibroblastos ( $\alpha$ -SMA y FSP-1), que habrían sufrido EMT, y otras células que corresponderían a fibroblastos residentes. FSP-1 se expresa en fibroblastos en diferentes órganos durante procesos de remodelación tisular, como riñón, pulmón y corazón<sup>176-178</sup>, y se usa habitualmente como marcador de células epiteliales que sufren EMT durante fibrogenesis<sup>179</sup>. Sin embargo, la mayor parte de las células que aparecen en la MP son de origen hematopoyético, y gran parte de ellas coexpresan FSP-1. Esto sugiere la presencia de fibrocitos en la MP. Estos fibrocitos podrían estar colaborando en la aparición de ECM<sup>19</sup>. Otros grupos han demostrado también la presencia de células que coexpresan FSP-1 con marcadores hematopoyéticos en modelos murinos de daño renal<sup>180-181</sup>. Esto sugiere que la

expresión de este marcador por parte de células hematopoyéticas puede estar relacionada con procesos de regeneración tisular. Dado el elevado porcentaje de macrófagos presente en la cavidad peritoneal, al menos parte de las células CD45<sup>+</sup> presentes en la membrana podrían ser macrófagos. Se sabe que los monocitos de sangre periférica pueden diferenciarse a fibrocitos<sup>182</sup>. Se ha sugerido que los macrófagos expresan FSP-1 en situaciones de daño tisular, mientras que no se ha encontrado este marcador fibroblástico en cultivos primarios de macrófagos<sup>177</sup>. Esto indica que FSP-1 es marcador de una determinada subpoblación de macrófagos. Así, un estudio reciente indica que FSP-1<sup>+</sup> se expresa en una subpoblación de macrófagos inflamatorios en el hígado dañado, los cuales se caracterizan por un aumento de expresión de COX-2, y varias citoquinas y quimioquinas pero que no sintetizan colágeno ni expresan marcadores de miofibroblastos<sup>183</sup>. Nuestros resultados muestran una relación entre la aparición de nuevas células en la membrana a lo largo del tiempo y la formación de fibrosis. Así, las células hematopoyéticas que aparecen en la membrana peritoneal podrían colaborar en la producción de ECM de forma directa, secretando componentes de matriz, o indirecta, promoviendo la activación de células fibroblastoides mediante la secreción de factores proinflamatorios y profibrogénicos.



**Figura 7.-**

*Posible mecanismo implicado en el engrosamiento de la MP y posterior desarrollo de fibrosis.*

*Las células hematopoyéticas reclutadas a la cavidad peritoneal como consecuencia del proceso inflamatorio crónico existente infiltran la membrana peritoneal y podrían colaborar en la generación de más matriz extracelular y en la progresión de la fibrosis y fallo de UF.*

En resumen, estos resultados indican que, ante la exposición a LD, se produce en la MP un aumento progresivo de células con características fibroblásticas, que promueven formación de ECM y fibrosis. Esto está relacionado con la migración de células inflamatorias a la cavidad peritoneal, que podrían infiltrar la membrana peritoneal y activar células residentes y/o colaborar en la aparición de fibrocitos (Figura 7).

Las citoquinas juegan un papel importante en la activación celular, tanto de células de origen hematopoiético como células estructurales (fibroblastos, mesoteliales, adipocitos, etc.)<sup>12,74,100,184</sup>. Estas citoquinas intervienen en el desarrollo de la fibrosis<sup>12</sup>. Así, IFN- $\gamma$  se ha relacionado con la adherencia fibrótica peritoneal<sup>45</sup>, IL-4 con fibrosis pulmonar<sup>97</sup> e IL-17 con fibrosis hepática<sup>185</sup>. Sin embargo, paradójicamente, dependiendo del modelo de estudio las mismas citoquinas pueden mostrar resultados opuestos. De este modo, por ejemplo, IFN- $\gamma$  se ha relacionado con reducción de fibrosis en un modelo de fibrosis pulmonar inducido por bleomicina<sup>98</sup> y se ha observado *in vitro* que inhibe la proliferación de fibroblastos y la producción de colágeno<sup>98</sup>. En DP también se han observado resultados contrapuestos. Así, se ha descrito tanto la existencia de una desviación hacia un patrón Th2 en pacientes estables de DP<sup>52</sup> como la acumulación de células de memoria Th1<sup>53</sup>. Esto puede estar relacionado con el modelo utilizado o la forma de abordar el estudio. Estas observaciones comentadas se basan en estudios realizados mediante estimulación *in vitro*. Nuestro modelo es importante en el estudio de estos factores porque la cavidad peritoneal no está siendo lavada constantemente, de forma que se encuentran más concentrados y podemos valorarlos directamente sin necesidad de estimulación *in vitro*. Sorprendentemente, no encontramos un patrón específico de respuesta inmunológica. Observamos concentraciones elevadas de citoquinas relacionadas con células T, tanto implicadas en un patrón Th1 (IFN $\gamma$ ) como Th2 (IL-4 e IL-5) y también Th17 (IL-17), así como citoquinas típicas de Tregs (IL-10), lo que indica que no existe un patrón predominante en estas células. El microambiente resultante de la concentración en que se encuentren estos factores marca el desarrollo del proceso y la aparición de fibrosis.

Se ha demostrado que la participación de la inflamación en la reparación tisular en determinados casos no parece ser algo esencial e incluso puede resultar desfavorable<sup>186</sup>. Así, se ha visto que ratones deficientes en macrófagos, neutrófilos y mastocitos (ratones deficientes en *PU.1*) son incapaces de generar una respuesta inflamatoria típica y muestran una regeneración tisular sin cicatriz<sup>187</sup>. Se sabe que el daño tisular en mamíferos adultos induce inflamación y puede dar lugar a la aparición de fibrosis y cicatrices como consecuencia de un proceso de regeneración tisular imperfecto<sup>15</sup>. En contraste con esto, durante el período fetal o embrionario, la respuesta inflamatoria inducida por daño es más tenue, y la curación de la herida se lleva a cabo sin formación de cicatriz<sup>15</sup>. Estos datos indican que la regulación de la inflamación puede ser una estrategia terapéutica de gran interés en el campo de la DP.



La presencia de GDPs y de AGEs derivados de éstos ha sido asociada con inflamación en distintos estudios<sup>62,67,80,86</sup>. Actualmente existen en el mercado LD con bajo contenido en GDPs. Para comprobar que estos LD pobres en GDPs generaban una menor inflamación y averiguar si una menor inflamación reducía efectivamente la aparición de fibrosis, decidimos probar estos líquidos en el modelo en ratón. Nuestros resultados señalan que los ratones expuestos de forma crónica a LD con baja concentración de GDPs mostraron menor número de células en los lavados peritoneales. Esta reducción es debida fundamentalmente a un menor reclutamiento de macrófagos, que a 35 días de tratamiento alcanza una fuerte significancia estadística. Hemos demostrado que esta población era precisamente la que sufría un mayor aumento en presencia de LD convencional. Además esto está relacionado con una importante disminución del grosor de la membrana peritoneal, tanto del infiltrado celular como de la fibrosis, lo que demuestra los beneficios de reducir la aparición de inflamación. Estos resultados sugieren que los macrófagos que acuden a la cavidad peritoneal pueden estar implicados en la aparición de más células en la membrana.

Tras estos resultados, estudiamos la eficacia de agentes antiinflamatorios e inmunomoduladores como terapia antifibrótica en el modelo. Este tipo de terapia es común en enfermedades fibroproliferativas, como el tratamiento con Metotrexato en esclerodermia y esclerosis sistémica<sup>188-189</sup>. Con respecto a los estudios en DP, distintos autores han observado una producción local de prostaglandinas (PGs) en la cavidad peritoneal de los pacientes. Éstas alcanzan concentraciones muy elevadas sobre todo durante episodios de peritonitis, habiéndose relacionado con una mayor permeabilidad peritoneal a macromoléculas<sup>132-133</sup>. Las PGs son mediadores de inflamación generadas por la enzima COX, con conocida actividad vasodilatadora e inmunoactivadora<sup>190-191</sup>. La inhibición de la síntesis de PGs mediante Indometacina, un agente antiinflamatorio inhibidor de COX-1 y COX-2, ha mostrado una bajada de la hiperpermeabilidad a macromoléculas durante las peritonitis<sup>192</sup>. Los agentes antiinflamatorios utilizados comúnmente basan su acción en la inhibición de COX, pero se ha postulado que la inhibición específica de COX-2 pueda ser un mecanismo más eficaz, reduciendo efectos adversos. Sin embargo, la participación de COX-2 durante la DP en el deterioro de la MP ha sido muy poco estudiada, pese a estar implicada en fenómenos inflamatorios. Esto nos llevó a estudiar la acción de un inhibidor específico de COX-2, Celecoxib, en nuestro modelo experimental.

La administración de este fármaco disminuye la inflamación, fundamentalmente caracterizada por una reducción del número de macrófagos presentes en el lavado peritoneal. Esto está en concordancia con recientes estudios que muestran que la COX-2 y la PGE<sub>2</sub> están implicadas en la migración de macrófagos<sup>193-194</sup> y en el aumento de MCP-1, una de las principales quimioquinas relacionadas con su reclutamiento<sup>193</sup>. Hemos demostrado que Celecoxib preserva la MP de los ratones tratados con LD. Estos datos reafirman la importancia de los macrófagos en el

engrosamiento de la membrana y la aparición de fibrosis. Por otra parte, la angiogénesis inducida por LD se reduce sólo de manera muy leve en ratones tratados con Celecoxib. Esto puede ser explicable por el hecho de que no sólo las células inflamatorias, sino también las mesoteliales y otras células presentes en el peritoneo, son capaces de producir diferentes factores proangiogénicos<sup>195-196</sup>, así como los fibroblastos activados<sup>197-198</sup>. Celecoxib no tiene efecto sobre la síntesis de dichos factores angiogénicos. La recuperación parcial de la función peritoneal en animales expuestos a LD y tratados con Celecoxib puede ser explicada por la inhibición de la síntesis de PGE<sub>2</sub>, lo que resulta en menor vasodilatación y por tanto menor permeabilidad vascular<sup>199</sup>.

Los resultados de este tratamiento con un inhibidor de COX-2 confirman que la inflamación es consecuencia de la exposición del peritoneo a LD y lleva al desarrollo de fibrosis, mientras que la angiogénesis no parece ser completamente dependiente de la reacción inflamatoria en estas circunstancias. La inhibición de COX-2 o prevención de su expresión puede mejorar los efectos adversos del LD en la MP; reduciendo la inflamación, la acumulación de matriz y el engrosamiento, lo que resultaría en una mejor capacidad de UF. Sin embargo sabemos que los inhibidores de COX-2 no pueden ser utilizados de forma generalizada en los pacientes de DP, al menos durante tratamientos prolongados, puesto que se ha visto que puede afectar al estado cardiovascular del paciente<sup>200</sup>, sobretodo en enfermos con ESRD (del inglés, End State of Renal Disease, estadio final de enfermedad renal), quienes tienen una mayor prevalencia de riesgo cardiovascular<sup>201</sup>. Aún así, creemos que estos resultados muestran evidencias que ratifican la factibilidad de considerar la inflamación como una diana terapéutica potencial para disminuir el deterioro de la membrana asociado a la DP.

Dada la limitación de empleo de agentes anti-COX-2 en estos pacientes, estudiamos otra vía de regulación de la inflamación, basada en el empleo de agentes moduladores de la respuesta inmune. La forma activa de la vitamina D tiene, además de su función clásica sobre el metabolismo del calcio y la formación de hueso, efectos sobre el crecimiento y la diferenciación de muchos tipos celulares, y un efecto inmunorregulador descrito en varios trabajos<sup>202-203</sup>. El receptor de vitamina D, VDR, se expresa en diferentes células de origen hematopoiético<sup>138-139</sup>. Dentro de la subpoblación de linfocitos T existen variaciones en la cantidad de VDR. Así, las células CD8<sup>+</sup> expresan concentraciones superiores a las CD4<sup>+</sup>, independientemente de si están activadas o no<sup>203</sup>. Además se ha visto en diferentes órganos que la vitamina D posee también actividad fibroprotectora<sup>141,204-205</sup>. Las propiedades inmunomoduladoras de la activación del VDR pueden estar relacionadas con la prevención de la fibrosis peritoneal, disminuyendo la secreción de citoquinas profibrogénicas por parte de células inflamatorias. Muchos pacientes en DP muestran cierto grado de hiperparatiroidismo secundario y necesitan suplemento de vitamina D debido a la baja

funcionalidad de sus riñones, por lo que nos pareció muy interesante comprobar si este tratamiento pudiera aportar beneficios añadidos en relación al tipo de respuesta inflamatoria generada.

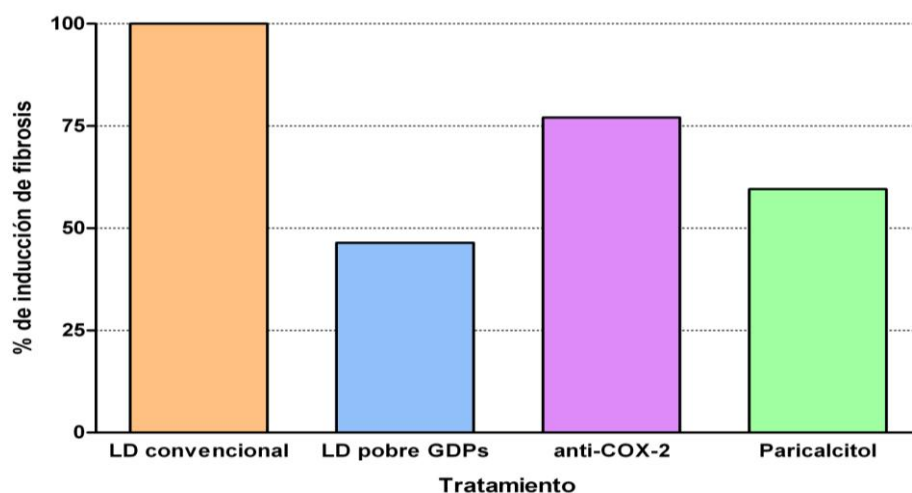
En el presente trabajo demostramos que la administración intraperitoneal de Paricalcitol reduce la fibrosis de la membrana peritoneal inducida por la exposición crónica a LD. Asimismo, reduce la angiogénesis mitigando el fallo de ultrafiltración. Hemos observado una reducción de células inflamatorias infiltrando la membrana peritoneal de ratones tratados con Paricalcitol. Sin embargo Paricalcitol tiende a aumentar el número total de células en la cavidad peritoneal. Análisis más detallados no mostraron cambios en el número de células B, granulocitos o macrófagos, mientras que sí aumentó el número de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Los números de células T en ambas subpoblaciones se correlacionan inversamente con engrosamiento de la membrana peritoneal. Estos resultados llamaron nuestra atención por la diferente forma de respuesta en comparación con los resultados que habíamos obtenido en los casos de LD pobre en GDPs y el tratamiento con Celecoxib. Por otra parte, observamos una disminución de IL-17, que ha sido correlacionada en distintos trabajos con trastornos fibroproliferativos<sup>104,106-110</sup>. Las células secretoras de IL-17 y las T reguladoras parecen tener un precursor común<sup>206</sup>; mediante la activación de la ruta de señalización de VDR se podría estimular la diferenciación a un fenotipo T regulador. Existen evidencias que demuestran que la ruta de señalización de VDR estimula la diferenciación de las células T a un fenotipo regulador<sup>149-151</sup>. En nuestro modelo, Paricalcitol promueve la aparición de células T CD8<sup>+</sup>, pero no CD4<sup>+</sup>, con fenotipo de células reguladoras. Las células T reguladoras juegan un papel importante en la regulación de citoquinas Th1, Th17 y Th2. El efecto del VDR en las vías Th2 todavía no está claro<sup>207-208</sup>. Sin embargo, se ha visto que la ruta de señalización del VDR inhibe Th1<sup>144-145</sup> y Th17<sup>146-147</sup>, reduciendo la inflamación. En conjunto, estas evidencias sugieren que el efecto antifibrogénico de Paricalcitol en la membrana peritoneal podría depender de la disminución de la IL-17 en la cavidad peritoneal, como consecuencia de una actividad reguladora de las células T CD8<sup>+</sup> presentes.

Por otra parte, habíamos relacionado anteriormente la presencia de macrófagos en lavados peritoneales con un incremento en la celularidad de la membrana peritoneal. En el caso del estudio con Paricalcitol esta población no muestra variaciones en los lavados y sin embargo la celularidad en la MP disminuye. Esto puede ser explicable por una reducción en la expresión de integrinas, como sugiere el trabajo de Wietrzyk<sup>209</sup>, que disminuiría la adhesión de estas células a la MP.

Los resultados demuestran que el activador del VDR posee efectos beneficiosos para la prevención de la fibrosis. Paricalcitol se administra actualmente de forma rutinaria principalmente por vía oral a un porcentaje elevado de pacientes en DP, para el tratamiento del hiperparatiroidismo secundario o como profilaxis del mismo. Los resultados de este estudio sugieren que Paricalcitol u

otros agentes activadores selectivos del VDR podrían constituir una buena estrategia terapéutica, administrados localmente junto con el LD.

Tras evaluar aisladamente el efecto de cada tratamiento sobre el estado de conservación de la membrana peritoneal, es muy interesante comparar los resultados obtenidos entre sí.



**Figura 8.-** Comparación cualitativa de los porcentajes de inducción de fibrosis con cada una de las terapias evaluadas en el trabajo. Porcentajes calculados en relación al control interno para cada experimento. Consideramos como 100% la mediana de los valores obtenidos con LD convencional.

Los datos mostrados en la Figura 8 indican que, comparativamente, el mecanismo más efectivo para evitar la formación de fibrosis es la utilización de LD con bajo contenido en GDPs. Nuestros resultados corroboran la importancia de estos productos de degradación en la generación de una respuesta inflamatoria clave para el desarrollo de fibrosis. Sin embargo, este tipo de LD de nuevo desarrollo supone un mayor coste económico. Una opción paralela a esta vía es la utilización de medicamentos. Así hemos comprobado que los medicamentos que actúan a nivel de la inflamación son una buena medida para evitar o retardar la aparición de fibrosis. Comparando los dos agentes empleados, comprobamos que Paricalcitol aporta mejores resultados. De hecho Paricalcitol induce un porcentaje de fibrosis muy similar al producido por el LD pobre en GDPs. Esto es muy importante dado que refleja que este medicamento cumple varios propósitos de tratamiento en pacientes de DP.

En resumen, estos resultados demuestran que la regulación de la actividad inflamatoria generada por los LD permitirá disminuir las complicaciones derivadas de los tratamientos de DP, principalmente la fibrosis. Así, proponemos la posibilidad de desarrollar terapias antifibróticas basadas en la desviación inmune. Consideramos que estos resultados tienen implicaciones más allá de los tratamientos de DP, puesto que podrían ser extrapolables a otras patologías relacionadas con procesos fibroproliferativos.





## **VI. CONCLUSIONES**



1. El desarrollo de este modelo animal es un novedoso avance que proporcionará una herramienta valiosa para desentrañar los mecanismos implicados en el deterioro de la MP y para estudiar los efectos de distintos medicamentos como terapia para el deterioro peritoneal.
2. El modelo generado en este trabajo presenta gran similitud con respecto a los daños que se generan en el peritoneo de pacientes sometidos a DP, lo que lo valida como técnica experimental.
3. El LD provoca en el peritoneo una reacción inflamatoria progresiva y crónica que correlaciona con la aparición de fibrosis y el fallo de ultrafiltración.
4. El proceso inflamatorio envuelve la migración principalmente de células T y macrófagos a la cavidad peritoneal, dirigida por la producción de diversas quimioquinas. Existe una producción local de citoquinas que pueden influir en el desarrollo de fibrosis.
5. La exposición continuada a LD promueve la aparición de células de origen hematopoyético en la membrana peritoneal que coexpresan el marcador fibroblástico FSP-1. Estas células podrían colaborar en la formación de matriz extracelular y aparición de fibrosis.
6. El desarrollo de nuevos LD más biocompatibles que impliquen una menor respuesta inflamatoria puede reducir el avance de los daños en la membrana peritoneal asociados al tratamiento con LD convencional.
7. El bloqueo de la actividad de COX-2 mediante Celecoxib reduce la aparición de fibrosis y angiogénesis *in vivo*. Los agentes antiinflamatorios pueden tener efectos beneficiosos sobre la fibrosis peritoneal.
8. La activación selectiva del receptor de vitamina D mediante Paricalcitol reduce la producción de IL-17 mediante un mecanismo aparentemente asociado a células T reguladoras. Esto favorece la conservación de la MP y reduce su engrosamiento. La utilización de agentes moduladores de la inflamación es una opción terapéutica valiosa para paliar los daños generados a consecuencia de la exposición del peritoneo a LD.

### Conclusión general:

Nuestra hipótesis inicial consistía en que la inflamación inducida por el líquido de diálisis tiene un papel importante en el desarrollo de la fibrosis. En nuestros resultados hemos caracterizado esta inflamación. Hemos demostrado que podemos disminuir el efecto fibrosante de la exposición a los LD mediante la utilización de fármacos antiinflamatorios y la utilización de sustancias inmunomoduladoras. Estos resultados confirman la hipótesis inicial.

## **VII. PERSPECTIVAS DE ESTA INVESTIGACIÓN**





Con este trabajo hemos desarrollado una nueva línea de investigación centrada en la generación de fibrosis y el papel de la inflamación generada por la exposición crónica a LD. El modelo desarrollado permitirá en el futuro el estudio del papel de los factores moleculares y celulares involucrados en el desarrollo de fibrosis. Para esto utilizaremos ratones knock-outs, así como técnicas de bloqueo de receptores o de citoquinas mediante anticuerpos o medicamentos específicos. Tal conocimiento permitirá generar tratamientos más específicos y eficaces para el desarrollo de la fibrosis peritoneal. Asimismo podrá contribuir a generar tratamientos para otras patologías fibroproliferativas.



## **VIII. BIBLIOGRAFÍA**





- 1 Selgas, R. *et al.* Consequences of peritonitis episodes appearing late during peritoneal dialysis (PD) in patients able to continue PD. *Adv Perit Dial* **14**, 168-172 (1998).
- 2 Di Paolo, N. & Sacchi, G. Atlas of peritoneal histology. *Perit Dial Int* **20 Suppl 3**, S5-96 (2000).
- 3 Mateijsen, M. A. *et al.* Vascular and interstitial changes in the peritoneum of CAPD patients with peritoneal sclerosis. *Perit Dial Int* **19**, 517-525 (1999).
- 4 Williams, J. D. *et al.* Morphologic changes in the peritoneal membrane of patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* **13**, 470-479 (2002).
- 5 Krediet, R. T., Lindholm, B. & Rippe, B. Pathophysiology of peritoneal membrane failure. *Perit Dial Int* **20 Suppl 4**, S22-42 (2000).
- 6 Krediet, R. T. The peritoneal membrane in chronic peritoneal dialysis. *Kidney Int* **55**, 341-356 (1999).
- 7 Williams, C. S. M., M.; DuBois, R.N. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* **18**, 7908-7916 (1999).
- 8 Romagnani, S., Maggi, E., Liotta, F., Cosmi, L. & Annunziato, F. Properties and origin of human Th17 cells. *Molecular Immunology* **47**, 3-7 (2009).
- 9 Midwood, K. S., Williams, L. V. & Schwarzbauer, J. E. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 1031-1037 (2004).
- 10 Chang, H. Y. *et al.* Gene Expression Signature of Fibroblast Serum Response Predicts Human Cancer Progression: Similarities between Tumors and Wounds. *PLoS Biol* **2**, e7 (2004).
- 11 Barrientos, S., Stojadinovic, O., Golinko, M. S., Brem, H. & Tomic-Canic, M. PERSPECTIVE ARTICLE: Growth factors and cytokines in wound healing. *Wound Repair and Regeneration* **16**, 585-601, doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00410.x (2008).
- 12 Stramer, B. M., Mori, R. & Martin, P. The Inflammation-Fibrosis Link? A Jekyll and Hyde Role for Blood Cells during Wound Repair. *J Invest Dermatol* **127**, 1009-1017 (2007).
- 13 Desmoulière, A. R., M.; Darby, I. and Gabbiani, G. . Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* **146**, 56-66 (1995).
- 14 Gabbiani, G., Ryan, G. B. & Majne, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* **27**, 549-550 (1971).
- 15 Ferguson, M. W. & O'Kane, S. Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **359**, 839-850 (2004).
- 16 Cowin, A. J., Brosnan, M. P., Holmes, T. M. & Ferguson, M. W. J. Endogenous inflammatory response to dermal wound healing in the fetal and adult mouse. *Developmental Dynamics* **212**, 385-393, doi:10.1002/(sici)1097-0177(199807)212:3<385::aid-aja6>3.0.co;2-d (1998).

- 17 Le Bousse-Kerdilès, M. C. M., M.C.; Samson, M. Cellular and molecular mechanisms underlying bone marrow and liver fibrosis: a review. *Eur Cytokine Netw* **19**, 69-80 (2008).
- 18 Truong, H. D., E.H.J. . Integrin switching modulates adhesion dynamics and cell migration. *Cell Adhesion & Migration* **3**, 179-181, doi:10.4161/cam.3.2.8036 (2009).
- 19 Bucala, R., Spiegel, L. A., Chesney, J., Hogan, M. & Cerami, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* **1**, 71-81 (1994).
- 20 Grimm, P. C. N., P.; Jeffery, J.; Savani, R.C.; Gough, J.; McKenna, R.M.; Stern, E.; Rush, D.N. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *N Engl J Med*. **345**, 93-97. (2001).
- 21 Phillips, R. J. B., M.D.; Hong, K.; Lutz, M.A.; Murray, L.A.; Xue, Y.Y.; Belperio, J.A.; Keane, M.P.; Strieter, R.M. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* **114**, 438-446 (2004).
- 22 Strieter, R. M., Gomperts, B. N. & Keane, M. P. The role of CXC chemokines in pulmonary fibrosis. *The Journal of Clinical Investigation* **117**, 549-556 (2007).
- 23 Boyer, B., Tucker, G. C., Vallés, A. M., Franke, W. W. & Thiery, J. P. Rearrangements of desmosomal and cytoskeletal proteins during the transition from epithelial to fibroblastoid organization in cultured rat bladder carcinoma cells. *The Journal of Cell Biology* **109**, 1495-1509, doi:10.1083/jcb.109.4.1495 (1989).
- 24 Zeisberg, E. M., Potenta, S., Xie, L., Zeisberg, M. & Kalluri, R. Discovery of Endothelial to Mesenchymal Transition as a Source for Carcinoma-Associated Fibroblasts. *Cancer Research* **67**, 10123-10128, doi:10.1158/0008-5472.can-07-3127 (2007).
- 25 Hinz, B. P., S.H.; Thannickal, V.J.; Galli, A.; Bochaton-Piallat, M.L.; Gabbiani, G. The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* **170**, 1807-1816 (2007).
- 26 Yung, S. & Chan, T. M. Peritoneal proteoglycans: much more than ground substance. *Perit Dial Int* **27**, 375-390, doi:27/4/375 [pii] (2007).
- 27 Brenner, D. A. Molecular Pathogenesis of Liver Fibrosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc*. **120**, 369–388 (2009).
- 28 Tamada, S. A., T.; Kuwabara, N.; Iwai, T.; Uchida, J.; Teramoto, K.; Kaneda, N.; Yukimura, T.; Komiya, T.; Nakatani, T.; Miura, K. . Molecular Mechanisms and Therapeutic Strategies of Chronic Renal Injury: The Role of Nuclear Factor  $\kappa$ B Activation in the Development of Renal Fibrosis. *Journal of Pharmacological Sciences* **100**, 17-21 (2006).
- 29 Blanco-Colio, L. M. M.-V., J.L.; Munoz-Garcia, B.; Moreno, JA.; Meilhac, O.; Ortiz, A.; Egido, J. TWEAK and Fn14. New players in the pathogenesis of atherosclerosis. *Front Biosci* **1**, 3648-3655 (2007).
- 30 Piorry, P. A. I. H., D. Traite des Alterations du Sang. . Paris, France: Bury & JB Bailliere (1840).
- 31 Pyper, R. A. Peritoneal Dialysis. *Ulster Med J* **17**, 179-187 (1948).
- 32 Chaimovitz, C. Peritoneal dialysis. *Kidney Int* **45**, 1226-1240 (1994).

- 33 Aguilera, A., Yanez-Mo, M., Selgas, R., Sanchez-Madrid, F. & Lopez-Cabrera, M. Epithelial to mesenchymal transition as a triggering factor of peritoneal membrane fibrosis and angiogenesis in peritoneal dialysis patients. *Curr Opin Investig Drugs* **6**, 262-268 (2005).
- 34 Dobbie, J. W. Pathogenesis of peritoneal fibrosing syndromes (sclerosing peritonitis) in peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* **12**, 14-27 (1992).
- 35 Li FK, D. A., Robson RL, Loetscher P, Rothlein R, Williams JD, Topley N. Leukocyte migration across human peritoneal mesothelial cells is dependent on directed chemokine secretion and ICAM-1 expression. *kidney Int* **54**, 2170-2183 (1998).
- 36 Flessner, M. F. The transport barrier in intraperitoneal therapy. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F433-442, doi:288/3/F433 [pii]10.1152/ajprenal.00313.2004 (2005).
- 37 Betjes, M. G. *et al.* Intraperitoneal interleukin-8 and neutrophil influx in the initial phase of a CAPD peritonitis. *Perit Dial Int* **16**, 385-392 (1996).
- 38 Ganguly, R. M., J.; Lazzell, V.; Waldman, R.H. Studies of human peritoneal cells: a normal saline lavage technique for the isolation and characterization of cells from peritoneal dialysis patients. *J Reticuloendothel Soc.* **27**, 303-310 (1980).
- 39 McLoughlin, R. Resolving peritoneal inflammation: flicking the right "switches". *Perit Dial Int* **25**, 223-229 (2005).
- 40 Turner, J.-E., Paust, H.-J., Steinmetz, O. M. & Panzer, U. The Th17 immune response in renal inflammation. *Kidney Int* **77**, 1070-1075 (2010).
- 41 Delves, P. J. R., I. M. The Immune System. Second Part of Two Parts. *New England Journal of Medicine* **343**, 108-117, doi:doi:10.1056/NEJM200007133430207 (2000).
- 42 Brauner, A. H., B.; Wretling, B. Tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-1 receptor antagonist in dialysate and serum from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *American journal of kidney diseases* **27**, 402-408 (1996).
- 43 Wang, H. H. L., C.Y. Interleukin-12 and -18 Levels in Peritoneal Dialysate Effluent Correlate With the Outcome of Peritonitis in Patients Undergoing Peritoneal Dialysis: Implications for the Type I/Type II T-Cell Immune Response. *American journal of kidney diseases* **46**, 328-338 (2005).
- 44 Glik, A. & Douvdevani, A. T LYMPHOCYTES: THE "CELLULAR" ARM OF ACQUIRED IMMUNITY IN THE PERITONEUM. *Perit Dial Int* **26**, 438-448 (2006).
- 45 Tzianabos, A. O. *et al.* Functional Th1 cells are required for surgical adhesion formation in a murine model. *J Immunol* **180**, 6970-6976, doi:180/10/6970 [pii] (2008).
- 46 Zhang, J. *et al.* Regulatory T cells/T-helper cell 17 functional imbalance in uraemic patients on maintenance haemodialysis: A pivotal link between microinflammation and adverse cardiovascular events. *Nephrology* **15**, 33-41, doi:10.1111/j.1440-1797.2009.01172.x (2010).
- 47 Maynard, C. L. W., C.T. Diversity in the contribution of interleukin-10 to T-cell-mediated immune regulation. *immunol Rev* **226**, 219-233 (2008).

- 48 Liechty, K. W., Kim, H. B., Adzick, N. S. & Crombleholme, T. M. Fetal wound repair results in scar formation in interleukin-10-deficient mice in a syngeneic murine model of scarless fetal wound repair. *J Pediatr Surg* **35**, 866-872; discussion 872-863 (2000).
- 49 Lewis, S. L., Kutvirt, S. G., Cooper, C. L., Bonner, P. N. & Holmes, C. J. Characteristics of peripheral and peritoneal lymphocytes from continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. *Perit Dial Int* **13**, S273-277 (1993).
- 50 Grzegorzewska, A. E. L., M. Lymphocyte subsets in the course of continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Adv Perit Dial.* **17**, 10-14 (2001).
- 51 Griveas, I. V., G.; Fleva, A.; Papadopoulou, D.; Mitsopoulos, E.; Nikopoulos, K.; Manou, E.; Kyriklidou, P.; Ginikopoulou, E.; Meimaridou, D.; Pavlitou, A.; Sakellariou, G. Lymphocytes subsets in the course of continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD). *Renal failure* **26**, 641-646 (2004).
- 52 Yokoyama, T. N., K.; Futatsuyama, K.; Hayashi, T.; Honda, K.; Uchida, K.; Kawashima, A.; Yumura, W.; Nihei, H. Identification of T Helper Cell Subsets in Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis Patients. *Nephron* **89**, 215-218 (2001).
- 53 Roberts, G. W. *et al.* Functional Effector Memory T Cells Enrich the Peritoneal Cavity of Patients Treated with Peritoneal Dialysis. *Journal of the American Society of Nephrology* **20**, 1895-1900, doi:10.1681/asn.2008101127 (2009).
- 54 Sandoval, P. *et al.* PPAR-[gamma] agonist rosiglitazone protects peritoneal membrane from dialysis fluid-induced damage. *Lab Invest* **90**, 1517-1532, doi:<http://www.nature.com/labinvest/journal/v90/n10/supinfo/labinvest2010111s1.html> (2010).
- 55 Herzenberg, L. A. K., A. B. B-cell lineages exist in the mouse. *Immunology Today* **14**, 79-83 (1993).
- 56 Popi, A. F., Lopes, J. D. & Mariano, M. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunology* **113**, 348-354, doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01969.x (2004).
- 57 Fernández de Castro, M. *et al.* Cell populations present in the nocturnal peritoneal effluent of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis and their relationship with peritoneal function and incidence of peritonitis. *Perit Dial Int* **14**, 265-270 (1994).
- 58 Pecoits-Filho R, C. M., Stenvinkel P, Lindholm B, Heimbürger O. . Systemic and intraperitoneal interleukin-6 system during the first year of peritoneal dialysis. *Perit Dial Int.* **Jan-Feb;26**, 53-63. (2006).
- 59 Montenegro, J. C.-R., R.; Riella, M.C. *et al.* Tratado de Diálisis Peritoneal. *Elsevier* (2009).
- 60 Ha, H., Yu, M. R. & Lee, H. B. High glucose-induced PKC activation mediates TGF-[bgr]1 and fibronectin synthesis by peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* **59**, 463-470 (2001).
- 61 Boulanger, E. *et al.* The triggering of human peritoneal mesothelial cell apoptosis and oncosis by glucose and glycoxydation products. *Nephrology Dialysis Transplantation* **19**, 2208-2216, doi:10.1093/ndt/gfh277 (2004).

- 62 Welten, A. G. *et al.* Single exposure of mesothelial cells to glucose degradation products (GDPs) yields early advanced glycation end-products (AGEs) and a proinflammatory response. *Perit Dial Int* **23**, 213-221 (2003).
- 63 Ha, H., Cha, M. K., Choi, H. N. & Lee, H. B. Effects of peritoneal dialysis solutions on the secretion of growth factors and extracellular matrix proteins by human peritoneal mesothelial cells. *Perit Dial Int* **22**, 171-177 (2002).
- 64 Inagi, R. *et al.* Glucose degradation product methylglyoxal enhances the production of vascular endothelial growth factor in peritoneal cells: role in the functional and morphological alterations of peritoneal membranes in peritoneal dialysis. *FEBS Lett* **463**, 260-264 (1999).
- 65 González Flecha F. L., C. P. R., Gagliardino J. J. and F.C. Rossi J. P. . La glucosilación no enzimática de proteínas. Mecanismo y papel de la reacción en la diabetes y el envejecimiento. *Ciencia al Día Internacional* **3** (2000).
- 66 Brownlee, M. P., S.; Cerami, A. Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosylated collagen. Role in the in situ formation of immune complexes. *J Exp Med* **158**, 1739-1744 (1983).
- 67 Schmidt, A. M. H., O.; Cao, R.; Yan, S.D.; Brett, J.; Wautier, J.L.; Ogawa, S.; Kuwabara, K.; Matsumoto, M.; Stern, D. RAGE: a novel cellular receptor for advanced glycation end products. *Diabetes* **45** S77-80 (1996).
- 68 Boulanger, E. *et al.* AGEs bind to mesothelial cells via RAGE and stimulate VCAM-1 expression. *Kidney Int* **61**, 148-156 (2002).
- 69 Hou, F. F. *et al.* Receptor for Advanced Glycation End Products on Human Synovial Fibroblasts: Role in the Pathogenesis of Dialysis-Related Amyloidosis. *Journal of the American Society of Nephrology* **13**, 1296-1306 (2002).
- 70 De Vriese, A. S., Tilton, R. G., Mortier, S. & Lameire, N. H. Myofibroblast transdifferentiation of mesothelial cells is mediated by RAGE and contributes to peritoneal fibrosis in uraemia. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 2549-2555 (2006).
- 71 Yanez-Mo, M. *et al.* Peritoneal dialysis and epithelial-to-mesenchymal transition of mesothelial cells. *N Engl J Med* **348**, 403-413 (2003).
- 72 Aroeira, L. S. *et al.* Mesenchymal conversion of mesothelial cells as a mechanism responsible for high solute transport rate in peritoneal dialysis: role of vascular endothelial growth factor. *Am J Kidney Dis* **46**, 938-948 (2005).
- 73 Tekstra, J. *et al.* Identification of the major chemokines that regulate cell influxes in peritoneal dialysis patients. *J Am Soc Nephrol* **7**, 2379-2384 (1996).
- 74 Topley, N. *et al.* Human peritoneal mesothelial cells synthesize interleukin-8. Synergistic induction by interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *Am J Pathol* **142**, 1876-1886 (1993).
- 75 Yao, V., Platell, C. & Hall, J. C. Peritoneal mesothelial cells produce inflammatory related cytokines. *ANZ J Surg* **74**, 997-1002 (2004).
- 76 Chung, D. R. *et al.* CD4+ T cells regulate surgical and postinfectious adhesion formation. *J Exp Med* **195**, 1471-1478 (2002).
- 77 Hay, E. D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* **154**, 8-20 (1995).



- 78 Birchmeier, C. B., W.; Brand-Saberi, B. Epithelial-mesenchymal transitions in cancer progression. *Acta Anat (Basel)* **156**, 217-226 (1996).
- 79 Leung, J. C. *et al.* Regulation of CCN2/CTGF and related cytokines in cultured peritoneal cells under conditions simulating peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* **24**, 458-469, doi:gfn524 [pii]10.1093/ndt/gfn524 (2009).
- 80 Schwenger, V. *et al.* Damage to the peritoneal membrane by glucose degradation products is mediated by the receptor for advanced glycation end-products. *J Am Soc Nephrol* **17**, 199-207 (2006).
- 81 Simm, A. *et al.* Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1. *FEBS Letters* **410**, 481-484 (1997).
- 82 Ashida, N., Arai, H., Yamasaki, M. & Kita, T. Distinct Signaling Pathways for MCP-1-dependent Integrin Activation and Chemotaxis. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 16555-16560, doi:10.1074/jbc.M009068200 (2001).
- 83 Guijarro, C. & Egido, J. Transcription factor-kappa B (NF-kappa B) in renal disease. *Kidney Int* **59**, 415-424 (2001).
- 84 Selzman, C. H. *et al.* Liposomal Delivery of Purified Inhibitory- $\{\kappa\}$ B $\{\alpha\}$  Inhibits Tumor Necrosis Factor- $\{\alpha\}$ -Induced Human Vascular Smooth Muscle Proliferation. *Circ Res* **84**, 867-875 (1999).
- 85 Erl, W. *et al.* Nuclear Factor- $\{\kappa\}$ B Regulates Induction of Apoptosis and Inhibitor of Apoptosis Protein-1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circ Res* **84**, 668-677 (1999).
- 86 Shanmugam, N., Kim, Y. S., Lanting, L. & Natarajan, R. Regulation of cyclooxygenase-2 expression in monocytes by ligation of the receptor for advanced glycation end products. *J Biol Chem* **278**, 34834-34844 (2003).
- 87 Cheng, H. F. *et al.* Cyclooxygenase-2 inhibitor blocks expression of mediators of renal injury in a model of diabetes and hypertension. *Kidney Int* **62**, 929-939 (2002).
- 88 Sitter, T. *et al.* High glucose increases prostaglandin E2 synthesis in human peritoneal mesothelial cells: role of hyperosmolarity. *J Am Soc Nephrol* **9**, 2005-2012 (1998).
- 89 Rao, P. K., E.E. Evolution of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J Pharm Sci* **11**, 81s-110s (2008).
- 90 Zareie, M. *et al.* Improved biocompatibility of bicarbonate/lactate-buffered PDF is not related to pH. *Nephrology Dialysis Transplantation* **21**, 208-216, doi:10.1093/ndt/gfi188 (2006).
- 91 Albrektsson, A. B., F.; Wieslander, A.; Braide, M. Peritoneal dialysis fluid-induced angiogenesis in rat mesentery is increased by lactate in the presence or absence of glucose. *ASAIO J* **52**, 276-281 (2006).
- 92 Margetts, P. J. & Bonniaud, P. Basic mechanisms and clinical implications of peritoneal fibrosis. *Perit Dial Int* **23**, 530-541 (2003).
- 93 Zareie, M. *et al.* Contribution of lactate buffer, glucose and glucose degradation products to peritoneal injury in vivo. *Nephrol Dial Transplant* **18**, 2629-2637 (2003).

- 94 Dinarello, C. A. The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol* **5**, s1-s13 (2002).
- 95 Roitt, I. B., J.; Male, D. Immunology. *Book Third edition* (1993).
- 96 Chung, K. F. Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *European Respiratory Journal* **18**, 50s-59s, doi:10.1183/09031936.01.00229701 (2001).
- 97 Wynn, T. A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* **214**, 199-210, doi:10.1002/path.2277 (2008).
- 98 Gu, Y. S. *et al.* The Immunobiology of Systemic Sclerosis. *Seminars in arthritis and rheumatism* **38**, 132-160 (2008).
- 99 SOBOTA, R. M. M., P. J.; HEINRICH, P.C. and SCHAPER, F. Prostaglandin E1 inhibits IL-6-induced MCP-1 expression by interfering specifically in IL-6-dependent ERK1/2, but not STAT3, activation. *Biochem. J.* **412**, 65-72 (2008).
- 100 JONES, S. A., HORIUCHI, S., TOPLEY, N., YAMAMOTO, N. & FULLER, G. M. The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease. *The FASEB Journal* **15**, 43-58, doi:10.1096/fj.99-1003rev (2001).
- 101 Fiorentino, D. F. B., M.W.; Mosmann, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* **170**, 2081-2095 (1989).
- 102 Asadullah, k. S., W. and Volk, D. . Interleukin-10 Therapy-Review of a New Approach. . *Pharmacol Rev* **55**, 241-269 (2003).
- 103 Amore, A. a. C., R. . Immunological basis of inflammation in dialysis. . *Nephrol Dial Transplant* **17** 16-24 (2002 ).
- 104 Simonian, P. L. *et al.* Th17-Polarized Immune Response in a Murine Model of Hypersensitivity Pneumonitis and Lung Fibrosis. *The Journal of Immunology* **182**, 657-665 (2009).
- 105 Chung, D. R. *et al.* CD4+ T cells mediate abscess formation in intra-abdominal sepsis by an IL-17-dependent mechanism. *J Immunol* **170**, 1958-1963 (2003).
- 106 Daniels, M. D., Hyland, K. V., Wang, K. & Engman, D. M. Recombinant cardiac myosin fragment induces experimental autoimmune myocarditis via activation of Th1 and Th17 immunity. *Autoimmunity* **41**, 490-499, doi:doi:10.1080/08916930802167902 (2008).
- 107 Wilson, M. S. M., S.K.; Ramalingam, T.R.; Gochuico, B.R.; Rosas, I.O.; Cheever, A.W.; Wynn, T.A. . Bleomycin and IL-1 $\beta$ -mediated pulmonary fibrosis is IL-17A dependent. *J Exp Med* **207**, 535-552 (2010).
- 108 Dong, X., Bachman, L. A., Miller, M. N., Nath, K. A. & Griffin, M. D. Dendritic cells facilitate accumulation of IL-17 T cells in the kidney following acute renal obstruction. *Kidney Int* **74**, 1294-1309, doi:<http://www.nature.com/ki/journal/v74/n10/supinfo/ki2008394s1.html> (2008).
- 109 Faust, S. M. L., G.; Marini, B. L.; Zou, W.; Gordon, D.; Iwakura, Y.; Laouar, Y.; Bishop, D. K. Role of T Cell TGF $\beta$  Signaling and IL-17 in Allograft Acceptance and Fibrosis Associated with Chronic Rejection. *The Journal of Immunology* **183**, 7297-7306, doi:10.4049/jimmunol.0902446 (2009).

- 110 Zhang, Q. *et al.* Tumor-Like Stem Cells Derived from Human Keloid Are Governed by the Inflammatory Niche Driven by IL-17/IL-6 Axis. *Plos one* **4**, e7798 (2009).
- 111 Lee, S. K. *et al.* High glucose induces MCP-1 expression partly via tyrosine kinase-AP-1 pathway in peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* **60**, 55-64 (2001).
- 112 Haslinger, B., Mandl-Weber, S., Sellmayer, A. & Sitter, T. Hyaluronan fragments induce the synthesis of MCP-1 and IL-8 in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Cell Tissue Res* **305**, 79-86 (2001).
- 113 Haslinger, B., Mandl-Weber, S., Sellmayer, A., Lederer, S. R. & Sitter, T. Effect of high glucose concentration on the synthesis of monocyte chemoattractant protein-1 in human peritoneal mesothelial cells: involvement of protein kinase C. *Nephron* **87**, 346-351 (2001).
- 114 Robben, P. M. L., M.; Kuziel, W.A.; Sibley, L.D. Recruitment of Gr-1+ monocytes is essential for control of acute toxoplasmosis. *J Exp Med* **201**, 1761-1769 (2005).
- 115 Taub, D. D. *et al.* Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), -2, and -3 are chemotactic for human T lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation* **95**, 1370-1376 (1995).
- 116 Kovacs, E. J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. *Immunology Today* **12**, 17-23 (1991).
- 117 Antoniadou, H. N. N.-G., J.; Galanopoulos, T.; Kradin, R. L.; Valente, A. J.; Graves, D. T. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 mRNA in human idiopathic pulmonary fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5371-5375 (1992).
- 118 Smith, R. E. *et al.* A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J Leukoc Biol* **57**, 782-787 (1995).
- 119 Low, Q. E. H. *et al.* Wound Healing in MIP-1{alpha}-/- and MCP-1-/- Mice. *Am J Pathol* **159**, 457-463 (2001).
- 120 Ward, S. G. a. W., J. Chemokines: understanding their role in T-lymphocyte biology. *biochem J* **333**, 457-470 (1998).
- 121 Wynn, T. A. a. B., L. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis* **30**, 245-257 (2010).
- 122 Cook, D. The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *Journal of Leukocyte Biology* **59**, 61-66 (1996).
- 123 Wolpe, S. D. D., G.; Sherry, B.; Beutler, B.; Hesse, D.G.; Nguyen, H.T.; Moldawer, L.L.; Nathan, C.F.; Lowry, S.F.; Cerami, A. Macrophages secrete a novel heparin-binding protein with inflammatory and neutrophil chemokinetic properties. *J Exp Med* **167**, 570-581 (1988).
- 124 Powell, D. W. *et al.* Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **277**, C1-C19 (1999).
- 125 LEASK, A. & ABRAHAM, D. J. TGF- $\beta$  signaling and the fibrotic response. *The FASEB Journal* **18**, 816-827, doi:10.1096/fj.03-1273rev (2004).
- 126 Leask, A. TGF $\beta$ , cardiac fibroblasts, and the fibrotic response. *Cardiovascular Research* **74**, 207-212, doi:10.1016/j.cardiores.2006.07.012 (2007).

- 127 Sanjabi, S., Zenewicz, L. A., Kamanaka, M. & Flavell, R. A. Anti-inflammatory and pro-inflammatory roles of TGF- $\beta$ , IL-10, and IL-22 in immunity and autoimmunity. *Current Opinion in Pharmacology* **9**, 447-453 (2009).
- 128 Sgonc, R. & Wick, G. Pro- and anti-fibrotic effects of TGF- $\beta$  in scleroderma. *Rheumatology* **47**, v5-v7, doi:10.1093/rheumatology/ken275 (2008).
- 129 Jimenez-Heffernan, J. A. *et al.* Immunohistochemical characterization of fibroblast subpopulations in normal peritoneal tissue and in peritoneal dialysis-induced fibrosis. *Virchows Arch* **444**, 247-256 (2004).
- 130 Flessner, M. F. *et al.* Peritoneal changes after exposure to sterile solutions by catheter. *J Am Soc Nephrol* **18**, 2294-2302 (2007).
- 131 Flessner, M. F. *et al.* PERITONEAL INFLAMMATION AFTER TWENTY-WEEK EXPOSURE TO DIALYSIS SOLUTION: EFFECT OF SOLUTION VERSUS CATHETER-FOREIGN BODY REACTION. *Perit Dial Int* **30**, 284-293, doi:10.3747/pdi.2009.00100 (2010).
- 132 Steinhauer, H. B. & Schollmeyer, P. Prostaglandin-mediated loss of proteins during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* **29**, 584-590 (1986).
- 133 Zemel, D. *et al.* Relationship of TNF- $\alpha$ , interleukin-6, and prostaglandins to peritoneal permeability for macromolecules during longitudinal follow-up of peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* **122**, 686-696 (1993).
- 134 Stratton, R. S., Xu. Role of prostaglandins in fibroblast activation and fibrosis. *J. Cell Commun. Signal.* **4**, 75-77 (2010).
- 135 Liu, P. T. S., S.; Li, H.; Wenzel, L.; Tan, B.H.; Krutzik, S.R.; Ochoa, M.T.; Schaubert, J.; Wu K.; Meinken, C.; Kamen, D.L.; Wagner, M.; Bals, R.; Steinmeyer, A.; Zügel, U.; Gallo, R.L.; Eisenberg, D.; Hewison, M.; Hollis, B.W.; Adams, J.S.; Bloom, B.R.; Modlin, R.L. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* **24**, 1770-1773 (2006).
- 136 Lemire, J. M. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Journal of cellular biochemistry* **49**, 26-31 (1992).
- 137 Dusso, A. S. B., A. J.; and Slatopolsky, E. . Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* **289** F8-F28 (2005).
- 138 Bikle, D. D. Vitamin D and Immune Function: Understanding Common Pathways. *Curr Osteoporos Rep.* **7**, 58-63 (2009).
- 139 Veldman CM, C. M., DeLuca HF. Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system. *Arch Biochem Biophys.* **374**, 334-338. (2000).
- 140 Tan, X., Li, Y. & Liu, Y. Paricalcitol attenuates renal interstitial fibrosis in obstructive nephropathy. *J Am Soc Nephrol* **17**, 3382-3393 (2006).
- 141 Li, Y., Spataro, B. C., Yang, J., Dai, C. & Liu, Y. 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression. *Kidney Int* **68**, 1500-1510 (2005).
- 142 Artaza, J. N. & Norris, K. C. Vitamin D reduces the expression of collagen and key profibrotic factors by inducing an antifibrotic phenotype in mesenchymal multipotent cells. *J Endocrinol* **200**, 207-221, doi:10.1677/joe-08-0241 (2009).

- 143 Tan, X., Wen, X. & Liu, Y. Paricalcitol Inhibits Renal Inflammation by Promoting Vitamin D Receptor-Mediated Sequestration of NF- $\kappa$ B Signaling. *J Am Soc Nephrol* **19**, 1741-1752, doi:10.1681/asn.2007060666 (2008).
- 144 van Halteren, A. G. S. *et al.* Redirection of Human Autoreactive T-Cells Upon Interaction With Dendritic Cells Modulated by TX527, an Analog of 1,25 Dihydroxyvitamin D3. *Diabetes* **51**, 2119-2125, doi:10.2337/diabetes.51.7.2119 (2002).
- 145 Ma, Y. *et al.* Identification and characterization of noncalcemic, tissue-selective, nonsecosteroidal vitamin D receptor modulators. *The Journal of Clinical Investigation* **116**, 892-904 (2006).
- 146 Colin, E. M. *et al.* 1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates Th17 polarization and interleukin-22 expression by memory T cells from patients with early rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* **62**, 132-142, doi:10.1002/art.25043 (2010).
- 147 Tang, J. *et al.* Calcitriol Suppresses Antiretinal Autoimmunity through Inhibitory Effects on the Th17 Effector Response. *The Journal of Immunology* **182**, 4624-4632, doi:10.4049/jimmunol.0801543 (2009).
- 148 Mathieu C, A. L. The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol Med.* **8**, 174-179. (2002 ).
- 149 Jeffery, L. E. *et al.* 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3. *J Immunol* **183**, 5458-5467, doi:10.4049/jimmunol.0803217 (2009).
- 150 Daniel, C., Sartory, N. A., Zahn, N., Radeke, H. H. & Stein, J. M. Immune Modulatory Treatment of Trinitrobenzene Sulfonic Acid Colitis with Calcitriol Is Associated with a Change of a T Helper (Th) 1/Th17 to a Th2 and Regulatory T Cell Profile. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **324**, 23-33, doi:10.1124/jpet.107.127209 (2008).
- 151 Gorman, S. *et al.* Topically applied 1,25-dihydroxyvitamin D3 enhances the suppressive activity of CD4+CD25+ cells in the draining lymph nodes. *J Immunol* **179**, 6273-6283, doi:10.1124/jpet.107.127209 (2007).
- 152 Barrell, G. K., McFarlane, R. G., Slow, S., Vasudevamurthy, M. K. & McGregor, D. O. CAPD in Sheep Following Bilateral Nephrectomy. *Perit Dial Int* **26**, 598- (2006).
- 153 Gotloib, L. C., P.; Rodella, H.; Oreopoulos, D.G.; Zellerman, G.; Ogilvie, R.; Husdan, H.; Brandes, L.; Vas, S. Experimental model for studies of continuous peritoneal dialysis in uremic rabbits. *Nephron* **31**, 254-259 (1982).
- 154 Wieczorowska, K., Khanna, R., Moore, H. L., Nolph, K. D. & Twardowski, Z. J. Rat model of peritoneal fibrosis: preliminary observations. *Adv Perit Dial* **11**, 48-51 (1995).
- 155 Ni, J. *et al.* Functional and molecular characterization of a peritoneal dialysis model in the C57BL/6J mouse. *Kidney Int* **67**, 2021-2031 (2005).
- 156 Shin, S. K., Kamerath, C. D., Gilson, J. F. & Leypoldt, J. K. Effects of anaesthesia on fluid and solute transport in a C57BL6 mouse model of peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant* **21**, 2874-2880 (2006).



- 157 Ni, J. *et al.* Aquaporin-1 plays an essential role in water permeability and ultrafiltration during peritoneal dialysis. *Kidney Int* **69**, 1518-1525 (2006).
- 158 Nakayama, M. Y., H.; Ikeda, M.; Hasegawa, T.; Kato, N.; Takahashi, H.; Otsuka, Y.; Yokoyama, K.; Yamamoto, R.; Kawaguchi, Y.; Hosoya, T. Risk factors and preventive measures for encapsulating peritoneal sclerosis--Jikei experience 2002. *Adv Perit Dial* **18**, 144-148 (2002).
- 159 Wang, A. Y.-M. *et al.* Is a Single Time Point C-Reactive Protein Predictive of Outcome in Peritoneal Dialysis Patients? *Journal of the American Society of Nephrology* **14**, 1871-1879, doi:10.1097/01.asn.0000070071.57901.b3 (2003).
- 160 Pecoits-Filho, R. *et al.* Plasma and dialysate IL-6 and VEGF concentrations are associated with high peritoneal solute transport rate. *Nephrol Dial Transplant* **17**, 1480-1486 (2002).
- 161 Lee, C.-T. *et al.* Proinflammatory Cytokines, Hepatocyte Growth Factor and Adipokines in Peritoneal Dialysis Patients. *Artificial Organs* **34**, E222-E229, doi:10.1111/j.1525-1594.2010.01000.x (2010).
- 162 Lai, K. N. L., J. C. K. . Peritoneal adipocytes and their role in inflammation during peritoneal dialysis. *Mediators Inflamm* **2010**, 1-10 (2010).
- 163 Cichy, J., Rose-John, S., Pryjma, J. & Travis, J. Effect of Soluble Interleukin-6 Receptor on Interleukin-6 Synthesis in Human Skin Fibroblasts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **227**, 318-321 (1996).
- 164 Witowski, J. *et al.* Human peritoneal fibroblasts are a potent source of neutrophil-targeting cytokines: a key role of IL-1beta stimulation. *Lab Invest* **89**, 414-424, doi:labinvest20091 [pii]10.1038/labinvest.2009.1 (2009).
- 165 Bellon, T. *et al.* Alternative activation of macrophages in human peritoneum: implications for peritoneal fibrosis. *Nephrol Dial Transplant*, doi:gfq771 [pii]10.1093/ndt/gfq771 (2011).
- 166 Modur, V., Li, Y., Zimmerman, G. A., Prescott, S. M. & McIntyre, T. M. Retrograde inflammatory signaling from neutrophils to endothelial cells by soluble interleukin-6 receptor alpha. *The Journal of Clinical Investigation* **100**, 2752-2756 (1997).
- 167 Riesenhuber, A. *et al.* PERITONEAL DIALYSIS FLUID INDUCES p38-DEPENDENT INFLAMMATION IN HUMAN MESOTHELIAL CELLS. *Perit Dial Int*, pdi.2009.00206, doi:10.3747/pdi.2009.00206 (2010).
- 168 Yung, S. & Chan, T. M. INTRINSIC CELLS: MESOTHELIAL CELLS -- CENTRAL PLAYERS IN REGULATING INFLAMMATION AND RESOLUTION. *Perit Dial Int* **29**, S21-27 (2009).
- 169 Nevado, J. *et al.* Amadori adducts activate nuclear factor-kappaB-related proinflammatory genes in cultured human peritoneal mesothelial cells. *Br J Pharmacol* **146**, 268-279 (2005).
- 170 Sakamoto, N. *et al.* Influence of glucose and inflammatory cytokines on TGF-beta1 and CTGF mRNA expressions in human peritoneal mesothelial cells. *Int J Mol Med* **15**, 907-911 (2005).

- 171 Niedermeier, M. *et al.* CD4<sup>+</sup> T cells control the differentiation of Gr1<sup>+</sup> monocytes into fibrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 17892-17897, doi:10.1073/pnas.0906070106 (2009).
- 172 Karlmark, K. R. *et al.* Hepatic recruitment of the inflammatory Gr1<sup>+</sup> monocyte subset upon liver injury promotes hepatic fibrosis. *Hepatology* **50**, 261-274, doi:10.1002/hep.22950 (2009).
- 173 Almeida, S. R. *et al.* Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int Immunol* **13**, 1193-1201 (2001).
- 174 Katoh, S. T., A.; Migita, M.; Kudo, A.; Takatsu, K. Conversion of normal Ly-1-positive B-lineage cells into Ly-1-positive macrophages in long-term bone marrow cultures. *Dev Immunol* **1**, 113-125 (1990).
- 175 Donze, H. H. *et al.* Human peritoneal B-1 cells and the influence of continuous ambulatory peritoneal dialysis on peritoneal and peripheral blood mononuclear cell (PBMC) composition and immunoglobulin levels. *Clin Exp Immunol* **109**, 356-361 (1997).
- 176 Strutz, F. *et al.* Identification and characterization of a fibroblast marker: FSP1. *The Journal of Cell Biology* **130**, 393-405, doi:10.1083/jcb.130.2.393 (1995).
- 177 Lawson, W. E. *et al.* Characterization of Fibroblast-specific Protein 1 in Pulmonary Fibrosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **171**, 899-907, doi:10.1164/rccm.200311-1535OC (2005).
- 178 Schneider, M. *et al.* S100A4 is upregulated in injured myocardium and promotes growth and survival of cardiac myocytes. *Cardiovascular Research* **75**, 40-50, doi:10.1016/j.cardiores.2007.03.027 (2007).
- 179 Iwano, M. *et al.* Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* **110**, 341-350 (2002).
- 180 Inoue, T., Plieth, D., Venkov, C. D., Xu, C. & Neilson, E. G. Antibodies against macrophages that overlap in specificity with fibroblasts. **67**, 2488-2493 (2005).
- 181 Le Hir, M., Hegyi, I., Cueni-Loffing, D., Loffing, J. & Kaissling, B. Characterization of renal interstitial fibroblast-specific protein 1/S100A4-positive cells in healthy and inflamed rodent kidneys. *Histochemistry and Cell Biology* **123**, 335-346, doi:10.1007/s00418-005-0788-z (2005).
- 182 Abe, R., Donnelly, S. C., Peng, T., Bucala, R. & Metz, C. N. Peripheral Blood Fibrocytes: Differentiation Pathway and Migration to Wound Sites. *J Immunol* **166**, 7556-7562 (2001).
- 183 Osterreicher, C. H. *et al.* Fibroblast-specific protein 1 identifies an inflammatory subpopulation of macrophages in the liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 308-313, doi:10.1073/pnas.1017547108 [pii]10.1073/pnas.1017547108 (2011).
- 184 Skurk, T. *et al.* Expression and Secretion of RANTES (CCL5) in Human Adipocytes in Response to Immunological Stimuli and Hypoxia. *Hormone and metabolic research. Hormon- und Stoffwechselforschung* **41**, 183,189 (2009).
- 185 Wang, L. C., S.; Xu, K. IL-17 expression is correlated with hepatitis B-related liver diseases and fibrosis. *Int J Mol Med*, doi:10.3892/ijmm.2011.594. (2011).

- 186 Martin, P. & Leibovich, S. J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* **15**, 599-607 (2005).
- 187 Martin, P. *et al.* Wound healing in the PU.1 null mouse--tissue repair is not dependent on inflammatory cells. *Curr Biol* **13**, 1122-1128 (2003).
- 188 Nihtyanova, S. I. & Denton, C. P. Current Approaches to the Management of Early Active Diffuse Scleroderma Skin Disease. *Rheumatic Disease Clinics of North America* **34**, 161-179 (2008).
- 189 Van Den Hoogen, F. H. J. *et al.* COMPARISON OF METHOTREXATE WITH PLACEBO IN THE TREATMENT OF SYSTEMIC SCLEROSIS: A 24 WEEK RANDOMIZED DOUBLE-BLIND TRIAL, FOLLOWED BY A 24 WEEK OBSERVATIONAL TRIAL. *Rheumatology* **35**, 364-372, doi:10.1093/rheumatology/35.4.364 (1996).
- 190 Portanova, J. P. *et al.* Selective neutralization of prostaglandin E2 blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin 6 production in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **184**, 883-891, doi:10.1084/jem.184.3.883 (1996).
- 191 Sakata, D., Yao, C. & Narumiya, S. Prostaglandin E2, an Immunoactivator. *Journal of Pharmacological Sciences* **112**, 1-5 (2010).
- 192 Zemel, D. *et al.* Effects of intraperitoneal cyclooxygenase inhibition on inflammatory mediators in dialysate and peritoneal membrane characteristics during peritonitis in continuous ambulatory peritoneal dialysis. *J Lab Clin Med* **126**, 204-215 (1995).
- 193 Tajima, T. *et al.* Lipopolysaccharide Induces Macrophage Migration via Prostaglandin D2 and Prostaglandin E2. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **326**, 493-501, doi:10.1124/jpet.108.137992 (2008).
- 194 Yu, J. *et al.* Expression of a cyclo-oxygenase-2 transgene in murine liver causes hepatitis. *Gut* **56**, 991-999, doi:10.1136/gut.2006.097923 (2007).
- 195 Lai, K. N. *et al.* Changes of cytokine profiles during peritonitis in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Am J Kidney Dis* **35**, 644-652 (2000).
- 196 Lai, K. N., Tang, S. C. & Leung, J. C. Mediators of inflammation and fibrosis. *Perit Dial Int* **27 Suppl 2**, S65-71 (2007).
- 197 Giatromanolaki, A., Kotsiou, S., Koukourakis, M. I. & Sivridis, E. Angiogenic factor expression in hepatic cirrhosis. *Mediators Inflamm* **2007**, 67187 (2007).
- 198 Tunyogi-Csapo, M. *et al.* Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis. *J Orthop Res* **25**, 1378-1388 (2007).
- 199 Yang, A. H., Chen, J. Y. & Lin, J. K. Myofibroblastic conversion of mesothelial cells. *Kidney Int* **63**, 1530-1539 (2003).
- 200 Harris, R. C. & Breyer, M. D. Update on cyclooxygenase-2 inhibitors. *Clin J Am Soc Nephrol* **1**, 236-245 (2006).
- 201 Garcia-Lopez, E., Carrero, J. J., Suliman, M. E., Lindholm, B. & Stenvinkel, P. Risk factors for cardiovascular disease in patients undergoing peritoneal dialysis. *Perit Dial Int* **27 Suppl 2**, S205-209 (2007).
- 202 Casteels, K. B., R.; Waer, M.; Mathieu C. Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **4** 313-318. (1995 ).

- 203 Deluca, H. F. C., M.T. Vitamin D: its role and uses in immunology. *Faseb J* **15**, 2579-2585 (2001).
- 204 Balkan, C. E., B.; Nese, N. Myelofibrosis associated with severe vitamin D deficiency rickets. *J Int Med Res* **33**, 356-359 (2005).
- 205 Rostand, S. G. & Drueke, T. B. Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int* **56**, 383-392 (1999).
- 206 Suh, W.-K. & Chaudhuri, J. Lymphocytes in action. *EMBO Rep* **9**, 841-846 (2008).
- 207 Staeva-Vieira, T. P. & Freedman, L. P. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Inhibits IFN- $\gamma$  and IL-4 Levels During In Vitro Polarization of Primary Murine CD4<sup>+</sup> T Cells. *The Journal of Immunology* **168**, 1181-1189 (2002).
- 208 Boonstra, A. *et al.* 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxyvitamin D3 Has a Direct Effect on Naive CD4<sup>+</sup> T Cells to Enhance the Development of Th2 Cells. *The Journal of Immunology* **167**, 4974-4980 (2001).
- 209 Wietrzyk J, F. B., Milczarek M, Kłopotowska D, Maciejewska M, Dąbrowska K, Kurzepa A, Dzimira S, Madej J, Kutner A. The influence of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and 1,24-dihydroxyvitamin D3 on  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin expression in cancer cell lines. *Oncol Rep.* **20**, 941-952. (2008).

## **IX. ANEXO**





**Los resultados presentados en esta tesis han sido parcialmente publicados o enviados a publicar en:**

- **Artículos originales:**

**Guadalupe T. González-Mateo**, Jesús Loureiro, José A. Jiménez-Heffernan, M<sup>a</sup>Auxiliadora Bajo, Rafael Selgas, Manuel López-Cabrera, Luiz S. Aroeira. *Chronic Exposure of Mouse Peritoneum to Peritoneal Dialysis Fluid: Structural and Functional Alterations of the Peritoneal Membrane*. Perit Dial Int, March 2009, Vol. 29, pp. 227–233

**G. T. González-Mateo**, J. Loureiro-Álvarez, S. Rayego-Mateos, M. Ruiz-Ortega, M. López-Cabrera, R. Selgas y L. S. Aroeira. *Animal models of peritoneal dialysis: relevance, difficulties, and future. -Modelos animales de diálisis peritoneal: relevancia, dificultades y futuro*. Nefrología (2008) Supl. 6, 17-22.

Aroeira LS, Lara-Pezzi E, Loureiro J, Aguilera A, Ramírez-Huesca M, **González-Mateo G**, Pérez-Lozano ML, Albar-Vizcaíno P, Bajo MA, del Peso G, Sánchez-Tomero JA, Jiménez-Heffernan JA, Selgas R, López-Cabrera M. *Cyclooxygenase-2 mediates dialysate-induced alterations of the peritoneal membrane*. J Am Soc Nephrol. 2009 Mar;20(3):582-92. Epub 2009 Jan 21

Luiz S. Aroeira, Jesús Loureiro, **Guadalupe T. González-Mateo**, Vanessa Fernandez-Millara, Gloria del Peso, José Antonio Sánchez-Tomero, Marta Ruiz-Ortega, M. Auxiliadora Bajo, Manuel López-Cabrera, Rafael Selgas. *CHARACTERIZATION OF EPITHELIAL-TO-MESENCHYMAL TRANSITION OF MESOTHELIAL CELLS IN A MOUSE MODEL OF CHRONIC PERITONEAL EXPOSURE TO HIGH GLUCOSE DIALYSATE*. Perit Dial Int, 2008; 28(S5):S29–S33

**Guadalupe Tirma González-Mateo**, Vanessa Fernández-Míllara, Manuel López-Cabrera, Marta Ruiz-Ortega, Rafael Selgas, Luiz Stark Aroeira. *Paricalcitol®, a vitamin D receptor activator, selectively modulates inflammatory IL-17 and prevents fibrosis in a mouse model of peritoneal dialysis*. Artículo enviado para publicación.

**Guadalupe Tirma González-Mateo**, Vanessa Fernández-Míllara, Manuel López-Cabrera, Rafael Selgas, Luiz Stark Aroeira. *Characterization of peritoneal dialysis fluid-induced inflammation*. Artículo enviado para publicación.

- **Contribución a libros:**

Tratado de Diálisis Peritoneal. Jesús Montenegro. 2009. Elsevier España, S.L. Capítulo 34: Diálisis Peritoneal experimental. Págs 617-628.

- **Otros trabajos publicados durante el desarrollo de la tesis:**

M<sup>a</sup>Auxiliadora Bajo, M<sup>a</sup>Luisa Pérez-Lozano, Patricia Albar-Vizcaíno, Gloria del Peso, M<sup>a</sup> José Castro, **Guadalupe T. González-Mateo**, Antonio Fernández Perpén, Abelardo Aguilera, Rafael Sánchez-Villanueva, J.A. Sánchez Tomero, Manuel López-Cabrera, Mirjam E. Peter, Jutta Passlick-Deetjen and Rafael Selgas. Low-GDP peritoneal dialysis fluid (Balance) has less impact in vitro and ex vivo on epithelial to mesenchymal transition (EMT) of mesothelial cells than a standard fluid. *Nephrol Dial Transplant* 2011 Jan;26(1):282-91. Epub 2010 Jun 22.PMID: 20571097

Sandoval P, Loureiro J, **González-Mateo G**, Pérez-Lozano ML, Maldonado-Rodríguez A, Sánchez-Tomero JA, Mendoza L, Santamaría B, Ortiz A, Ruíz-Ortega M, Selgas R, Martín P, Sánchez-Madrid F, Aguilera A, López-Cabrera M. PPAR- $\gamma$  agonist rosiglitazone protects peritoneal membrane from dialysis fluid-induced damage. *Lab Invest.* 2010 Oct;90(10):1517-32. Epub 2010 Jun 7.PMID: 20531289

R. Selgas, G. del Peso, R. Sánchez-Villanueva, L.S. Aroeira, **G. González-Mateo**, J. Loureiro, J. Portolés, C. Remón, A. Fernández Perpén, J.A. Sánchez Tomero, J. Jiménez-Hefferman, M.A.Bajo. *Actualidades en diálisis peritoneal: Del laboratorio a la clínica*. Nefrología 2009;29 (sup.ext.5):68-73

Loureiro J, Schilte M, Aguilera A, Albar-Vizcaíno P, Ramírez-Huesca M, Pérez-Lozano LM, **González-Mateo G**, Aroeira LS, Selgas R, Mendoza L, Ortiz A, Ruíz-Ortega M, van den Born J, Beelen RH, López-Cabrera M. *BMP-7 blocks mesenchymal conversion of mesothelial cells and prevents peritoneal damage induced by dialysis fluid exposure*. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Jan 12.

- **Revisiones:**

- Revisión en preparación para NDT.

Los resultados de esta tesis han sido parcialmente presentados en los siguientes congresos científicos:

Poster presentations:

- *Paricalcitol. Activador del receptor de vitamina D, modula selectivamente la IL-17 y previene fibrosis en un modelo en ratón de Diálisis Peritoneal.* **González-Mateo G.T.**, Fernández-Millara V., López-Cabrera M., Ruiz-Ortega M., Selgas R., Aroeira L.S. Congreso REDinREN, Madrid, 2010.
- *IL-17, un nuevo mediador en el tratamiento de la Diálisis Peritoneal.* Rodríguez-Díez R., Stark Aroeira L., Rodríguez-Díez R., Rayego S., **González-Mateo G.T.**, Ortiz A., López-Cabrera M., Selgas R., Ruiz-Ortega M. Congreso REDinREN, Madrid, 2010.
- *Efectos del Paricalcitol en el Desarrollo de Fibrosis Peritoneal en un Modelo de Diálisis Peritoneal en Ratón.* **González-Mateo G.T.**, Fernández-Millara V., Loureiro J., Aguilera A., del Peso G., Bajo M.A., López-Cabrera M., Selgas R., Aroeira L.S. VII Reunión Nacional de Diálisis Peritoneal. Coruña, España. 4-6 Febrero, 2010.
- *Caracterización de la inflamación inducida por los líquidos de diálisis en un modelo en ratón.* **González-Mateo G.T.**, Fernández-Millara V., Loureiro J., Aguilera A., del Peso G., Bajo M.A., López-Cabrera M., Selgas R., Aroeira L.S. VII Reunión Nacional de Diálisis Peritoneal. Coruña, España. 4-6 Febrero, 2010.
- *Characterization of Inflammation induced by Peritoneal Dialysis fluids.* **González-Mateo G. T.**, Rodríguez-Díez R., Rayego S., Loureiro J., Fernández-Millara V., Rodríguez-Díez R., Rodríguez García E., Ossorio M., del Peso G., Bajo M.A., Ruiz-Ortega M., López-Cabrera M., Selgas R., Aroeira L. S. The 9<sup>th</sup> European Peritoneal Dialysis Meeting. Strasbourg, France. October 9-12, 2009
- *Protective Effects of PPAR-g Agonist on Peritoneal Membrane Damage Induced by Peritoneal Dialysis.* Aguilera A., Loureiro J., Sandoval P., **González-Mateo G. T.**, Albar P., Maldonado A., Bajo M.A., Santamaría B., Aroeira L. S., Sánchez-Tomero J.A., Selgas R., López-Cabrera M. The 9<sup>th</sup> European Peritoneal Dialysis Meeting. Strasbourg, France. October 9-12, 2009
- *Inflamación peritoneal temprana en un modelo de exposición a líquidos de diálisis en ratón.* **González-Mateo G. T.**, Fernández-Millara V., Bajo M.A., López-Cabrera M., Selgas R., Aroeira L. S. XXXIX Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nefrología. Pamplona, España. Octubre 3-6, 2009.
- *Early Inflammatory Response of Peritoneal Membrana to Dialysis Fluid Exposure.* **González-Mateo G.T.**, Loureiro J., Rayego S., Sánchez-Tomero J.A., Selgas R., López-Cabrera M., Stark L. 12<sup>th</sup> Congress of th ISPD. Istanbul, Turkey. June 20-24, 2008.
- *Ciclo-oxigenase-2 Inhibitor Prevents Inflammation and Fibrosis Induced by Chronic PD, Without affecting Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells.* Stark L.S., Lara-Pezzi E., Loureiro J., **González-Mateo G.T.**, Jimenez-Heferman J.A., Ramirez-Huesca M., Aguilera A.,

Pérez-Lozano M.L., Sánchez-Tomero J.A., Selgas R., López-Cabrera M. 12<sup>th</sup> Congress of th ISPD. Istanbul, Turkey. June 20-24, 2008.

- Efectos de un líquido de diálisis peritoneal pobre en GDPs (Balance) en la transición epitelio-mesenquimal de la célula mesotelial in vivo. Selgas R., **González-Mateo G.T.**, del Peso G., Bajo M.A., Pérez-Lozano M.L., Fernández-Perpén A., Sánchez-Tomero J.A., López-Cabrera M. XXXVII Congreso Nacional de la S.E.N. Cádiz, 2007.

Oral abstracts:

- *Effects of GDPs-Reduced Dialysate (Balance®) for PD on the Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) of the Mesothelial Cell in vivo.* Selgas R., **González-Mateo G.T.**, del Peso G., Bajo M.A., Castro M.J., Aguilera A., Aroeira L. S., Fernández-Perpén A., Pérez-Lozano M.L., Sánchez-Tomero J.A., Sánchez-Villanueva R., López-Cabrera M. 12<sup>th</sup> Congress of th ISPD. Istanbul, Turkey. June 20-24, 2008.
- *Functional Relevance of VEGF Receptors Switch During Peritoneal Dialysis-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition of the Mesothelial Cells.* Selgas R., **González-Mateo G.T.**, del Peso G., Bajo M.A., Castro M.J., Aguilera A., Aroeira L. S., Fernández-Perpén A., Pérez-Lozano M.L., Sánchez-Tomero J.A., Sánchez-Villanueva R., López-Cabrera M. 12<sup>th</sup> Congress of th ISPD. Istanbul, Turkey. June 20-24, 2008.
- Efectos de un líquido de diálisis peritoneal pobre en GDPs (Balance) en la transición epitelio-mesenquimal (TEM) de la célula mesotelial in vivo. VI Reunión Nacional de Diálisis Peritoneal. Vitoria-Gasteiz, enero 2008.
- *Effects of GDPs-Reduced Dialysate (Balance®) for Peritoneal Dialysis on the Epithelial-to-Mesenchymal Transition of the Mesothelial Cell in vivo.* Selgas R., **González-Mateo G.T.**, del Peso G., Bajo M.A., Ramirez-Huesca M., Castro M.J., Aguilera A., Aroeira L. S., Fernández-Perpén A., Pérez-Lozano M.L., Sánchez-Tomero J.A., López-Cabrera M. 8<sup>th</sup> European Peritoneal Dialysis Meeting. Helsinki, Finland. July 7-10, 2007.

